PATENT COOPERATIC TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 21 August 2000 (21.08.00)	
International application No. PCT/EP99/10262	**Applicant's or agent's file reference** 7346 PCT
International filing date (day/month/year) 22 December 1999 (22.12.99)	**Priority date** (day/month/year) 22 December 1998 (22.12.98)
Applicant WOLLESCHENSKY, Ralf	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

[X] in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

20 July 2000 (20.07.00)

[] in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election [X] was

[] was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO **34, chemin des Colombettes** **1211 Geneva 20, Switzerland**	Authorized officer Olivia RANAIVOJAONA
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TRE Y

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

CARL ZEISS JENA GMBH
Tatzendpromenade 1a
D-07745 Jena
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 11 December 2000 (11.12.00)	
Applicant's or agent's file reference 7346 PCT	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/EP99/10262	**International filing date** (day/month/year) 22 December 1999 (22.12.99)

1. The following indications appeared on record concerning:

[X] the applicant [] the inventor [] the agent [] the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
CARL ZEISS JENA GMBH Tatzendpromenade 1a D-07745 Jena Germany	DE	DE
	Telephone No. (03641) 64-2400	
	Facsimile No. (03641) 64-2469	
	Teleprinter No. 331545	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

[] the person [] the name [X] the address [] the nationality [] the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
CARL ZEISS JENA GMBH Carl-Zeiss-Promenade 10 07745 Jena Germany	DE	DE
	Telephone No. (03641) 64-2400	
	Facsimile No. (03641) 64-2469	
	Teleprinter No. 331545	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

[X] the receiving Office
[] the International Searching Authority
[X] the International Preliminary Examining Authority
[] the designated Offices concerned
[X] the elected Offices concerned
[] other:

The International Bureau of WIPO **34, chemin des Colombettes** **1211 Geneva 20, Switzerland**	Authorized officer N. Lindner
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : G02B 21/00 — A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/37985

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Juni 2000 (29.06.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/10262

(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Dezember 1999 (22.12.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 59 314.7	22. Dezember 1998 (22.12.98)	DE
199 36 573.3	3. August 1999 (03.08.99)	DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: CARL ZEISS JENA GMBH [DE/DE]; Tatzendpromenade 1a, D–07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: WOLLESCHENSKY, Ralf [DE/DE]; An der Promenade 3, D–99510 Schöten (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: CARL ZEISS JENA GMBH; Tatzendpromenade 1a, D–07745 Jena (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: ARRANGEMENT FOR SEPARATING EXCITATION LIGHT AND EMISSION LIGHT IN A MICROSCOPE

(54) Bezeichnung: ANORDNUNG ZUR SEPARIERUNG VON ANREGUNGS– UND EMISSIONSLICHT IN EINEM MIKROSKOP

(57) Abstract

The invention relates to an arrangement of a light diffracting element for separating excitation light and emission light in a microscope beam path, preferably in a confocal microscope, and especially in a laser scanning microscope. According to the invention, the light diffracting element is passed through by both the excitation light as well as by the emission light, and at least one wavelength of the excitation is affected by diffracting, whereas other wavelengths emitted by the sample are passed through without being affected, thus being spatially separated from the excitation light.

(57) Zusammenfassung

Anordnung eines lichtbeugenden Elementes zur Separierung von Anregungs– und Emissionslicht in einem mikroskopischen Strahlengang, vorzugsweise in einem konfokalen Mikroskop, und insbesondere in einem Laser–Scanning–Mikroskop, wobei das lichtbeugende Element sowohl vom Anregungslicht als auch vom Emissionslicht durchlaufen wird und mindestens eine Wellenlänge der Anregung durch Beugung beeinflußt, während andere von der Probe emittierte Wellenlängen das Element unbeeinflußt durchlaufen und dadurch räumlich vom Anregungslicht getrennt werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Titel:

Anordnung zur Separierung von Anregungs- und Emissionslicht in einem Mikroskop

In Fig. 1-3 werden beispielhaft erfindungsgemäße Anordnungen erläutert.
In Fig.1 wird über einen Spiegel SP und einen Strahlteiler ST das Licht (Anregungslicht) zweier Laser L1,L2 mit unterschiedlichen Wellenlängen in einen gemeinsamen Strahlengang eingekoppelt,, der an der Seite S1 eines verspiegelten Prismas in Richtung eines AOTF (Acousto-OpticalTunable Filter) reflektiert wird.
Das Anregungslicht wird in den AOTF eingeführt, wobei in der ersten Ordnung gebeugtes Licht für über die Ansteuerfrequenz des AOTF eingestellte Wellenlänge genau in Richtung eines Pinholes PH mit vor - und nachgeordneter Pinholeoptik PHO zur Einstellung des Strahlprofiles abgelenkt wird, während andere mögliche Wellenlängen ungebeugt in nullter Ordnung den AOTF durchqueren
und nicht auf das Pinhole gelangen.
Das Pinhole PH dient hier gleichzeitig als Anregungs- und Detektionspinhole.
Über Scaneinheiten SC1, SC2 und eine Scanoptik SCO wird das Anregungslicht
in Richtung eines Mikroskopischen Strahlengangs MI in Richtung einer Probe abgebildet.
Das von der Probe emittierte Licht, bestehend aus Anteilen des Anregungslichtes
und wellenlängenverschobenen Flureszenzanteilen, durchläuft den Lichtweg in umgekehrter Richtung bis zum AOTF. Hier gelangen die Wellenlängenanteile des Anregungslichtes wiederum über die Beugung erster Ordnung auf die Spiegelseite S1 des Prismas PS, während die Fluoreszenzanteile den AOTF

ungebeugt in nullter Ordnung durchqueren und dadurch einen Winkel zum reflektierten Anregungslicht einnehmen.
Zwischen den rückkehrenden Strahlen nullter und erster Ordnung ist nun genau die Spitze zwischen den Prismenflächen S1 und S2 angeordnet, wodurch das Fluoreszenzlicht auf die Seite S2 trifft und von dieser in Richtung einer Detektionseinheit, hier beispielhaft bestehend aus einem Linienfilter LF, einem Farbteiler NFT und zwei Detektoren für unterschiedliche Wellenlängen , reflekiert wird.

Durch die niedrige Bandbreite des AOTF von ca. 2 nm Bandbreite für das Anregungslicht wirkt er als extremer Kantenfilter mit deutlichen Vorteilen etwa gegen dichroitische Filter mit Bandbreiten größer 10 nm.
Das ist von besonderer Bedeutung, weil der Abstand von Anregungswellenlänge und Fluoreszenzwellenlängen kleiner als 10 nm sein kann und durch die erfindungsgemäße Anordnung eine wellenlängenabhängige Trennung dennoch möglich ist.
Durch Frequenzänderung kann der AOTF von der Wellenlänge des Lasers L1 auf die Wellenlänge des Lasers L2 umgeschaltet werden und wiederum das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht getrennt werden.

Statt des Prismas mit den Seiten S1, S2 können auch zwei unabhängige, den Seiten S1,S2 entsprechende, aber nicht zusammenhängende Spiegel verwendet werden.
Ein Vorteil ist, daß diese auch drehbar ausgebildet sein können, um eine genaue Einstellung auf den AOTF bzw. die Detektion DE zu ermöglichen.
In Fig. 2 ist eine ähnliche Anordnung mit nur einem Scanner SC dargestellt.
Hier ist statt des Prismas ein Spiegel S vorgesehen, der das Anregungslicht in Richtung des AOTF analog zu Fig. 1 umlenkt, wobei hier das in nullter Ordnung zurückkehrende Fluoreszenzlicht durch den AOTF hindurchgehende Licht neben dem Spiegel S verläuft und auf diese Weise in Richtung einer hier nicht dargestellten Detektion gelangt.

Grundsätzlich sind auch Anordnungen denkbar , bei der der AOTF allein als Separationseinheit von Anregungslicht und Fluoreszenzlicht dienen kann,

indem das Laserlicht in Richtung der ersten Ordnung ohne ein vorgeschaltetes Element in den AOTF gelangt und das Detektionslicht unter einem Winkel zum Anregungslicht den AOTF verläßt und direkt in eine Detektioneinheit gelangt, was lediglich Auswirkungen auf die Baulänge hat, da der Winkel mit beispielsweise vier Grad recht klein ausfällt und Überlagerungen der Wellenlängenanteile vermieden werden sollen.

Weiterhin kann auch nur für das Fluoreszenzlicht ein separierender Spiegel vorgesehen sein.

In Fig. 3 ist eine weitere vorteilhafte Ausführung in Form eines unverspiegelten Prismas vorgesehen, das durch Brechung das Licht eines Anregungslasers in erster Ordnung in den AOTF hineinführt und die nullte Ordnung (das Fluoreszenzlicht) in Richtung der Detektion DE ablenkt.

Durch den Winkel zwischen erster und nullter Ordnung und unterschiedlicher Wellenlängen ist vorteilhaft eine deutliche Separierung der Wellenlängenanteile möglich.

Die Erfindung ist besonders vorteilhaft in einem Laser- Scanning´- Mikroskop mit einem AOTF anwendbar.

Andere vorteilhafte Anwendungen eines anderen lichtbeugenden Elementes zur Strahlungstrennung durch verschiedene Beugungsordnungen sind jedoch in einem mikroskopischen Strahlengang denkbar und vorteilhaft in den Umfang der Erfindung eingeschlossen.

So kann dieses vorteilhaft zur Regelung der Anregungsintensität eingesetzt werden.

In Fig. 4 sind vorteilhaft mehrere derartige Elemente , hier AOTF und AOM im Laserstrahlengang zur Einkopplung der Laserstrahlung vorgesehen.

Hier können mehrere Laserlinien L1-L3 wie UV/VIS oder IR simultan mit voneinander unabhängig einstellbarer Anregungsleistung oder einzeln eingekoppelt werden.

Patentansprüche

1.

Anordnung eines lichtbeugenden Elementes zur Separierung von Anregungs- und Emissionlicht in einem mikroskopischen Strahlengang, vorzugsweise in einem konfokalen Mikroskop, und insbesondere in einem Laser- Scanning - Mikroskop.

2.

Anordnung nach Anspruch 1, wobei das lichtbeugende Element sowohl vom Anregungslicht als auch vom Emissionslicht durchlaufen wird.

2a.

Anordnung nach Anspruch 2, wobei das von der Probe emittierte Licht aus Anteilen des Anregungslichtes und wellenlängenverschobenen Flureszenzanteilen besteht.

3.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei das lichtbeugende Element mindestens eine Wellenlänge der Anregung durch Beugung beeinflußt, während andere von der Probe emittierte Wellenlängen das Element unbeeinflußt durchlaufen und dadurch räumlich vom Anregungslicht getrennt werden.

3a

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche , wobei das lichtbeugende Element durch Frequenzänderung von einer ersten Wellenlänge eines ersten Lasers auf eine zweite Wellenlänge eines zweiten Lasers umgeschaltet wird.

4.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei im Anregungsstrahlengang vor dem Element und/ oder im Detektionsstrahlengang nach dem Element zur verbesserten Trennung der Lichtanteile mindestens ein die Lichtrichtung beeinflussendes optisches Element vorgesehen ist.

5.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einem AOTF als lichtbeugendes Element.

6.
Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einem Reflexionselement als optisches Element

7.
Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einem lichtbrechenden Element als optisches Element

8.
Anordnung eines lichtbeugenden Elementes zur Separierung von Anregungs- und Emissionlicht in einem mikroskopischen Strahlengang, vorzugsweise in einem
konfokalen Mikroskop, und insbesondere in einem Laser- Scanning - Mikroskop,
insbesondere nach einem der Ansprüche 1-7,
wobei dieses auch zur Regelung der Anregungsintensität eingesetzt wird.

9..
Anordnung mehrerer lichtbeugenden Elemente in einem mikroskopischen Strahlengang, vorzugsweise in einem konfokalen Mikroskop, und insbesondere in einem Laser- Scanning – Mikroskop, insbesondere nach einem der Ansprüche 1-8,
wobei diese simultan oder einzeln zur Einkopplung unterschiedlicher Wellenlängen eingesetzt werden.

10. Anordnung nach Anspruch 9mit mehreren lichtbeugenden Elementen, wobei in Richtung der Detektion zuerst AOTF und dann AOM eingesetzt werden.

11.
Anordnung nach einem der vorangehende Ansprüche, wobei AOTF und oder AOM als lichtbeugende Elemente eingesetzt werden.

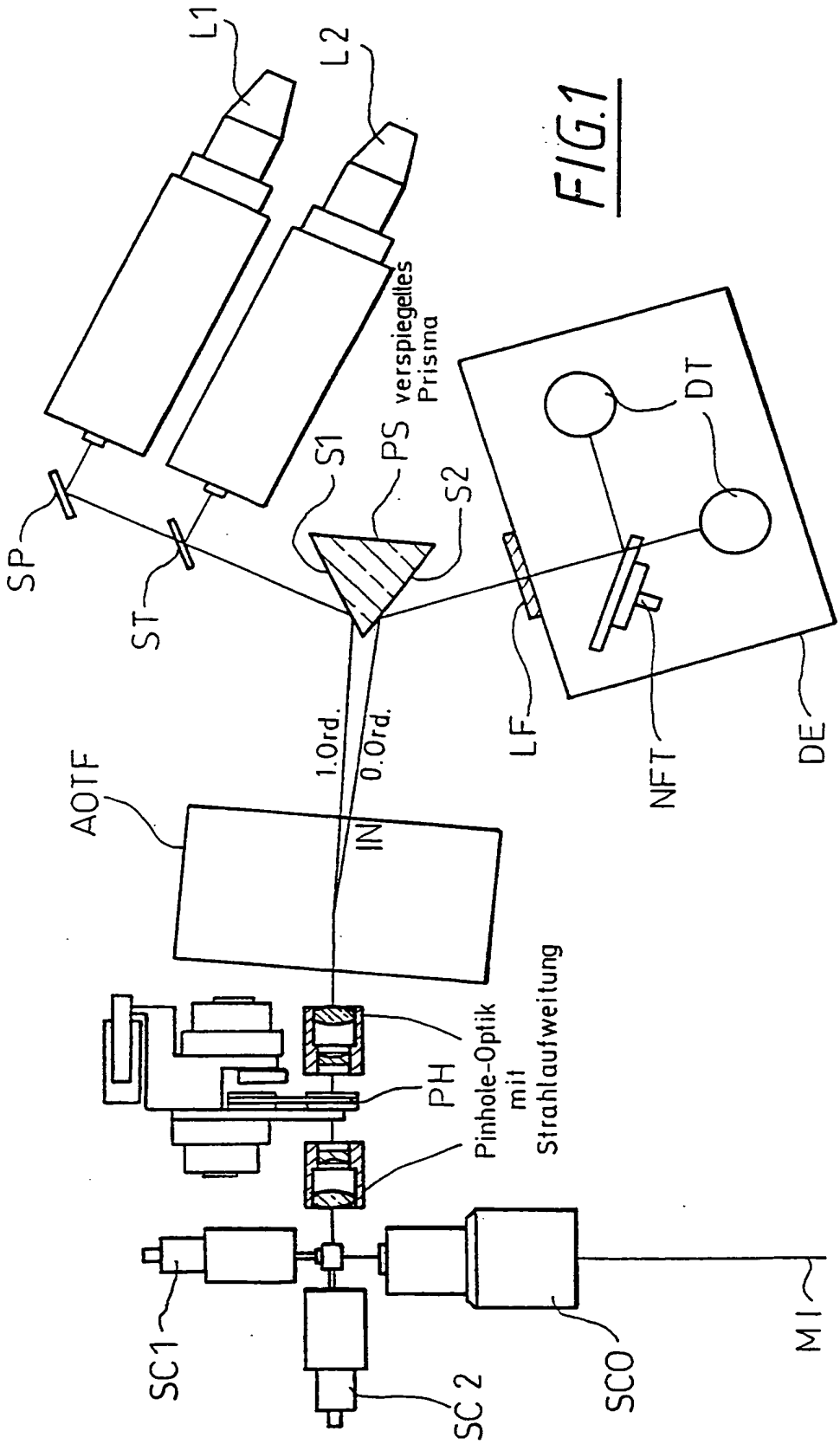

L1
L2
SP
ST
S1
PS
S2
verspiegeltes Prisma
DT
LF
NFT
DE
AOTF
1.Ord.
0.Ord.
IN
PH
Pinhole-Optik mit Strahlaufweitung
SC1
SC 2
SCO
MI

FIG.1

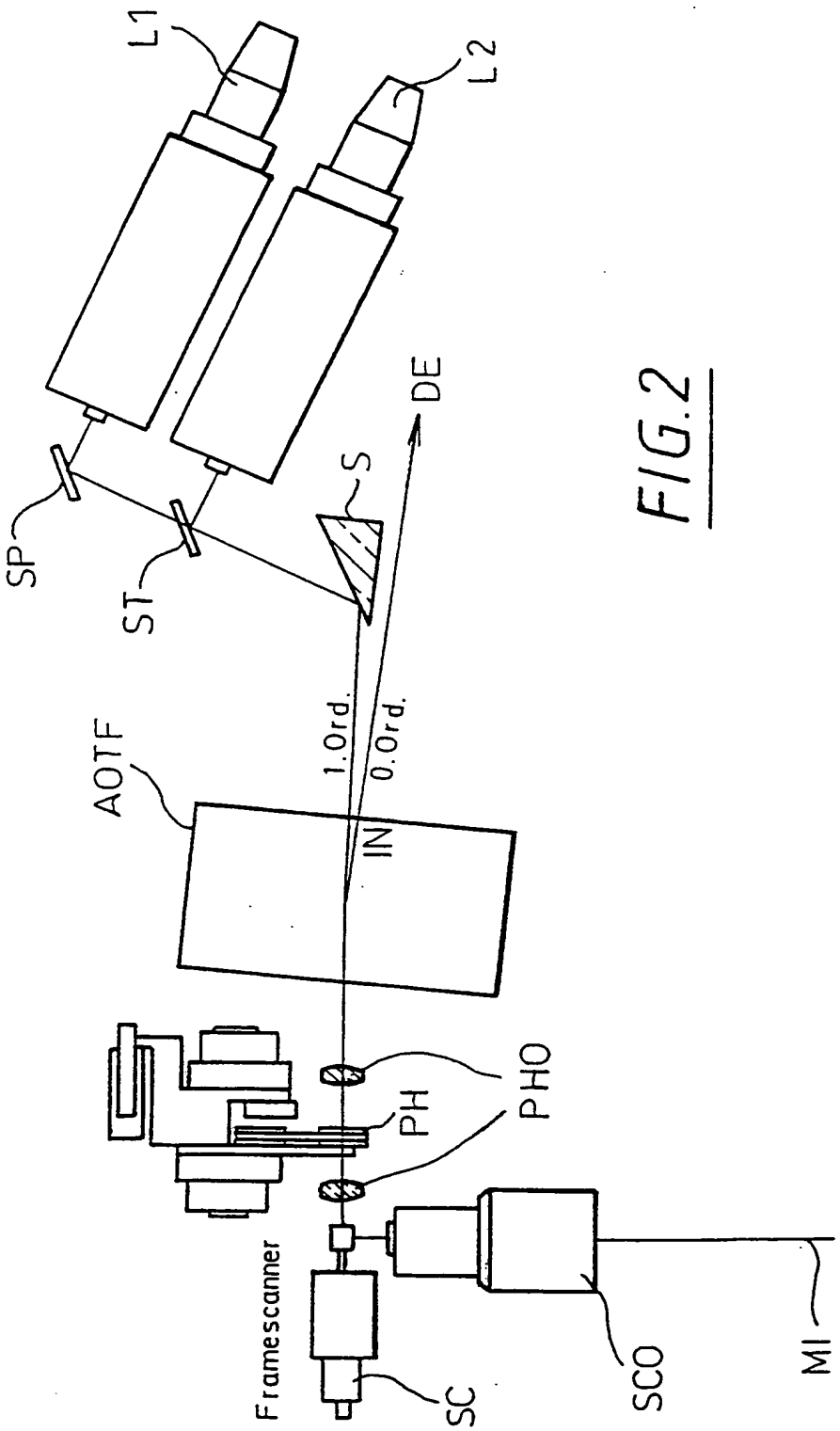


FIG.2

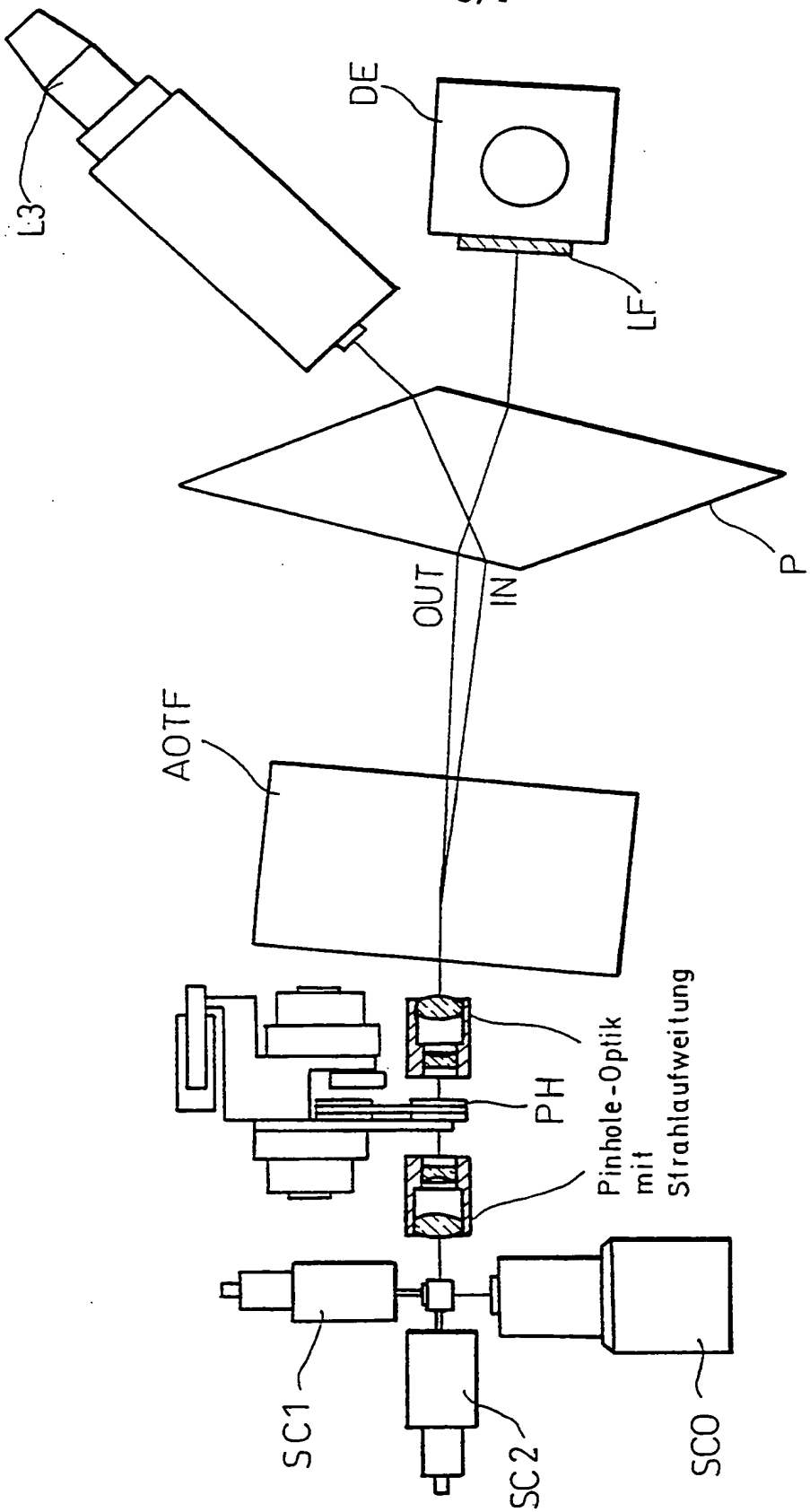

L3
DE
LF
P
OUT
IN
AOTF
PH
Pinhole-Optik
mit
Strahlaufweitung
SC1
SC2
SCO

FIG.3

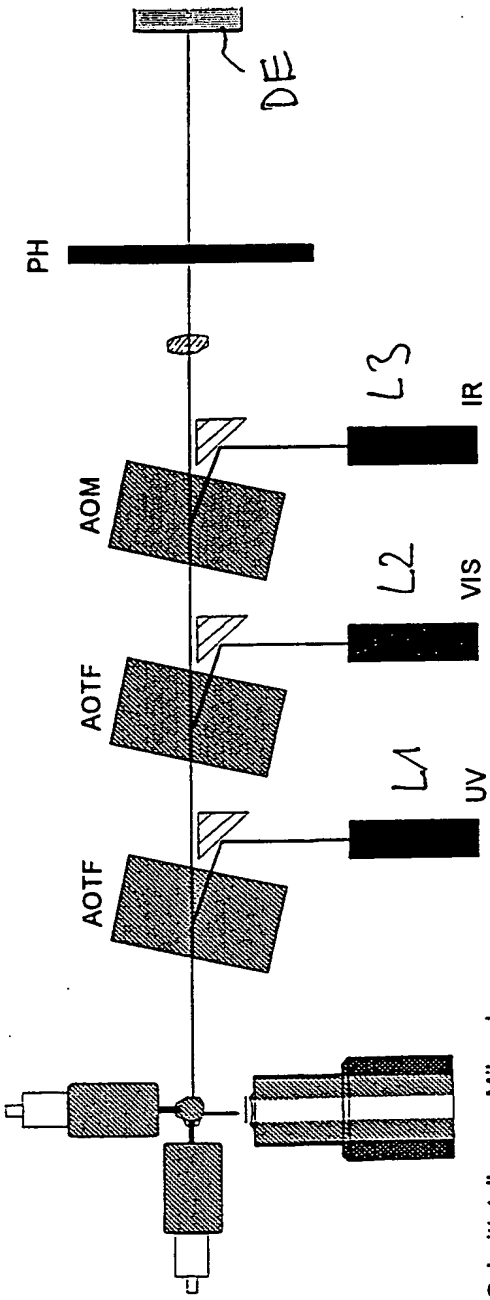


Fig. 4

Anregungslaser - können auch über Glasfaser in das Scanmodul gekoppelt werden.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 11 APR 2001
WIPO PCT

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	**WEITERES VORGEHEN**	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
7346 PCT		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Tag)*
PCT/EP99/10262	22/12/1999	22/12/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G02B21/00		
Anmelder CARL ZEISS JENA GMBH et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

 ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 10 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

 - I ☒ Grundlage des Berichts
 - II ☐ Priorität
 - III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags	Datum der Fertigstellung dieses Berichts
20/07/2000	05.04.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Thieme, W Tel. Nr. +49 89 2399 2597

Formblatt PCT/IPEA/409 (Deckblatt) (Januar 1994)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/10262

I. Grundlage d s Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-3 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-20 eingegangen am 28/03/2001 mit Schreiben vom 28/03/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

 Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

 ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).

 ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).

 ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

 ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

 ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

 ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

 ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

 ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

 ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

 (Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen;sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

 ☐ die Ansprüche eingeschränkt.

 ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.

 ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.

 ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

 ☐ erfüllt ist

 ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
 siehe Beiblatt

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

 ☒ alle Teile.

 ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja:	Ansprüche	1-20
	Nein:	Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja:	Ansprüche	1-20
	Nein:	Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja:	Ansprüche	1-20
	Nein:	Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt IV
Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Die Anmeldung wird als nicht einheitlich im Sinn von Regel 13 PCT angesehen. Zu den Gründen wird auf die Ausführungen der Recherche auf Formblatt PCT 206 verwiesen. Aus Gründen der Effizienz wird jedoch die gesamte Anmeldung geprüft.

Zu Punkt VIII
Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Die Anmeldung ist nicht klar im Sinn von Art.6 PCT.

1.1 Die Definition der Regelbarkeit des Anregungslichts im Anspruch 1 mittels des akustooptischen Modulators scheint der später definierten Trennung von rückgestrahltem Licht der Anregungswellenlänge und frequenzverschobenen Licht zu widersprechen. Eine Regelung der Intensität des Anregungslicht impliziert einen Beugungswirkungsgrad, der sich auf beliebige vorbestimmte Werte irgendwo zwischen 0 und 100% einstellen läßt. Eine Trennung zwischen Anregungslicht und Emissionslicht dagegen läßt sich nur mit einem Beugungswirkungsgrad von 100% erzielen. Diese Inkonsistenz führt zu Unklarheiten über die tatsächliche Funktion des akustooptischen Modulators.

1.2 Die Verwendung von Termen wie "transmittierbar", "regelbar", "einleitbar", "trennbar", "nachweisbar", "einkoppelbar", "umschaltbar", "einstellbar", zusammenführbar" im Anspruchssatz ist je nach Kontext häufig bar einer eindeutigen Definition, ob die beanspruchte Vorrichtung entsprechende Merkmale aufweist oder nur die prinzipielle Möglichkeit bietet, beispielsweise im Rahmen einer Nachrüstung, Mittel mit der angesprochenen Funktion zu addieren.

1.3 Die Bezugnahme in Anspruch 18 auf "simultan oder einzeln einkoppelbar" impliziert steuerbare lichtbeugende Elemente. Als einziges Beispiel werden in der Beschreibung akustooptische Elemente genannt. Somit ist die allgemeine Definition "lichtbeugende Elemente" nicht von der Beschreibung gestützt, und

kann auch vom Fachmann über die Breite des Anspruchs nicht ausgeführt werden.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Die Dokumente aus dem Recherchenbericht sind in der darin angegebenen Reihenfolge mit D1 bis D14 bezeichnet:

D1 WO 99 42884
D2 US-A-4 627 730
D3 EP-A-0 503 236
D4 US-A-5 751 417
D5 EP-A-0 562 488
D6 EP-A-0 620 458
D7 JP 04 157413 A, Patent Abstracts of Japan
D8 WO 97 30371 A
D9 EP-A-0 327 425
D10 JP 01 282515 A, Patent Abstracts of Japan
D11 DE 196 33 185 A
D12 DE 197 02 753 A
D13 DE 196 27 568 A
D14 EP-A-0 148 803

2. Das Mikroskop des Anspruchs 1, soweit er klar ist, scheint aus folgenden Gründen den Kriterien des Art.33 PCT zu genügen:

2.1 Dokument D8 (WO, 97 30371, A) offenbart ein Fluoreszenzmikroskop (siehe Seite 7, Zeile 8 bis Seite 8, Zeile 1) mit
* einer Strahlungsquelle 14, welche Anregungslicht aussendet (siehe Figur 1 und die zugehörige Beschreibung);

* mit einer Detektionseinrichtung 40 zum Nachweis von frequenzverschobenen Fluoreszenzlicht (siehe Figur 1 und die zugehörige Beschreibung);
* mit einer Mikroskopoptik 29, 30 zum Lenken von Anregungslicht auf die Probe 31 (siehe Figur 1 und zugehörige Beschreibung);
* mit einem akustooptischen Element 16 zur Beugung von Anregungslicht in die Mikroskopoptik 29, 30 (siehe Figur 1 und die zugehörige Beschreibung; siehe Anspruch 1);
* mit Mitteln zu Trennen von Fluoreszenzlicht und Anregungslicht (siehe Figur 1 und zugehörige Beschreibung; siehe Seite 8, Zeile 1 bis 9); und mit
* einer Filtereinrichtung 38 zum selektiven Nachweis von Fluoreszenzlicht vor der Detektionseinrichtung 40 (siehe Anspruch 2; der AOM dient zur Herausfilterung gesuchter Wellenlängen).

Somit unterscheidet sich das beanspruchte Fluoreszenzmikroskop von einem Gerät gemäß Dokument D8 vor allem dadurch, dass der Detektor bezüglich des akustooptischen Elements so angeordnet ist, dass ungebeugt durch das akustooptische Element transmittiertes Fluoreszenzlicht detektiert wird.

2.2 Dokument D2 (US 4 627 730, A) offenbart insbesondere in den Figuren 1a, 1b und der zugehörigen Beschreibung ein Lasermikroskop mit
* einer Strahlungquelle "LASER" zur Erzeugung von Beleuchtungslicht;
* einem Detektor "DETECTORS" zum Nachweis von der Probe rückgestrahltem Lichts; und
* einem akustooptischen Element, über welches Beleuchtungslicht zur Probe geführt wird und von der Probe rückgestreutes Licht zum Detektor geführt wird.

Davon unterscheidet sich beanspruchte Mikroskop im wesentlichen durch die Gestaltung der Detektoreinrichtung, welche für die Detektion von Fluoreszenzlicht ausgelegt ist, während der Detektor des Geräts der Entgegenhaltung auf eine phasensensitive Detektion von Bragg-gebeugtem Licht adaptiert ist.

2.3 Aufgrund der unterschiedlichen Aufgaben, welche der Detektion und den damit verbundenen Strahlführungen zu Grunde liegen, erscheint eine Kombination der Geräte von Dokument D2 und D8 als nicht nahegelegt.

2.4 Die weiteren zitierten Dokument sind von geringerer Bedeutung für Anspruch 1:

Keines der Dokumente D3, D4, D5, D6 und D13 befasst sich mit der Verwendung eines akustooptischen Modulators.

Dokument D7 schlägt die Verwendung eines akustooptischen Modulators zur Intensitätssteuerung von Licht vor, welches ungebeugt durch den Modulator läuft.

Die Dokumente D9, D10, D11 und D12 betreffen die Intensitätssteuerung von drei Lichtquellen verschiedener Frequenz mittels eines akustooptischen Modulators.

Dokument D14 beschreibt einen regelbaren, polychromatischen Strahlteiler auf der Basis von akustooptischen Modulatoren.

2.5 Aus den oben genannten Gründen lässt sich das Mikroskop von Anspruch 1 als neu und durch den verfügbaren Stand der Technik nicht nahegelegt betrachten.

3. Anspruch 18, wenn man die Definition "lichtbeugende Elemente" strikt im Sinn von "akustooptischen Modulatoren" interpretiert, scheint ebenfalls den Kriterien des Art.33 PCT zu genügen.

3.1 Dokument D10 beschreibt eine Beleuchtungsvorrichtung zur Einkopplung von Licht in den Strahlengang eines Mikroskops 19, 20, 22 mit
* einer Vielzahl von Lichtquellen 1, 2, 3 , welche Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren (siehe den Text);
* einer Vielzahl von akustooptischen Modulatoren 7,8,9;
* wobei jeder Lichtquelle ein Modulator zugeordnet ist (siehe die Figur);
* und wobei die unterschiedlichen Wellenlängen durch Beugung simultan oder einzeln in das Mikroskop einkoppelbar sind (klar aus der Figur).

Davon unterscheidet die beanspruchte Vorrichtung dadurch, dass die akusto-optischen Elemente auf einer gemeinsamen optischen Achse angeordnet sind und durch Beugung Licht der Lichtquellen entlang dieser Achse einkoppeln (siehe Figur 4 der Anmeldung).

3.2 Das Dokument D14 offenbart einen Strahlteiler mit akustooptischen Modulatoren auf einer gemeinsamen Achse zur Separierung eines einfallenden Lichtstrahls in Grundfarben. Dokument D14 enthält keinen Hinweis auf die Umgestaltung in der Weise, dass die Strahlen mehrerer farbiger Lichtquellen zu einem Gesamtstrahl vereinigt werden könnten.

3.3 Die weiteren zitierten Dokumente gehen nicht über den Stand der Technik hinaus, wie er im Dokument D10 beschrieben ist:

Dokumente D9 und D12 offenbaren drei akustooptische Modulatoren auf verschiedenen Achsen.

Dokument D11 beschreibt eine Beleuchtungseinrichtung mit einem akustooptischen Modulator und dichroitischen Strahlkombiniern.

Dokument D13 beschreibt eine Beleuchtungseinrichtung, bei der Strahlen über superponierte Hologramme zusammengeführt werden.

4. Die obigen Betrachtung treffen in gleicher Weise auf die abhänigen und die unabhängig formulierten Ansprüche 5 und 7 zu, weil sie alle Merkmale von Anspruch 1 beziehungsweise Anspruch 18 enthalten.

Zu Punkt VI
Bestimmte angeführte Unterlagen

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum *(Tag/Monat/Jahr)*	Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	Prioritätsdatum *(zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)*
WO 99 42 884 A	26.08.1999	19.02.1998	22.12.1998

Sieht man von der unklaren Beschreibung der Regelbarkeit ab, scheint das Gerät von Figur 2 der Entgegenhaltung das Mikroskop von Anspruch 1 vollständig vorwegzunehmen.

Weber & Heim

Deutsche Patentanwälte
European Patent Attorneys
Euro Trademark Attorneys

Irmgardstrasse 3
D-81479 München
Tel. 089-79 90 47
Fax 089-791 52 56

28. MRZ 2001

PCT/EP99/10262
Carl Zeiss
Z 173 - Hm/As

NEUE PATENTANSPRÜCHE

1. Fluoreszenzmikroskop, insbesondere konfokales Fluoreszenz-Lasermikroskop,
mit einer Strahlungsquelle (L_1, L_2, L_3), insbesondere einem Laser, welche Anregungslicht für eine Probe aussendet,
mit einer Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) zum Nachweis von von der Probe ausgesandtem Emissionslicht,
mit einer Mikroskopoptik zum Lenken von Anregungslicht auf die Probe und zum Lenken von Emissionslicht zurück in Richtung Strahlungsquelle und Detektionseinrichtung,
mit einem akustooptischen Element (AOM, AOTF) zur Beugung von Anregungslicht, mit welchem eine Intensität des gebeugten Anregungslichts regelbar ist und welches zwischen Strahlungsquelle und Mikroskopoptik so angeordnet ist, dass gebeugtes Anregungslicht in die Mikroskopoptik (SC1, SC2, SCO, M1) einleitbar ist,
 - wobei das von der Probe ausgesandte Emissionslicht Anteile von Anregungslicht und Anteile von wellenlängenverschobenem Fluoreszenzlicht aufweist,
 - von der Probe ausgesandtes Anregungslicht von der akustooptischen Einrichtung (AOM, AOTF) durch Beugung in Richtung der Strahlungsquelle ablenkbar ist,

- und von der Probe ausgesandtes wellenlängenverschobenes Fluoreszenzlicht ungebeugt durch das akustooptische Element (AOM, AOTF) transmittierbar und räumlich von Anregungslichtanteilen des Emissionslichts trennbar ist und
- wobei die Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) bezüglich des akustooptischen Elements so angeordnet ist, dass ungebeugt durch das akustooptische Element (AOM, AOTF) transmittiertes wellenlängenverschobenes Fluoreszenzlicht mittels der Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) nachweisbar ist, und

mit einer Filtereinrichtung (LF), welche zum selektiven Nachweis von wellenlängenverschobenem Fluoreszenzlicht in der Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) zwischen dem akustooptischen Element und der Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) angeordnet ist.

2. Fluoreszenzmikroskop nach Anspruch 1, dadurch g e k e n n z e i c h n e t, dass in einem Anregungsstrahlengang vor dem akustooptischen Element (AOM, AOTF) und/oder in einem Detektionsstrahlengang nach dem akustooptischen Element (AOM, AOTF) zur verbesserten Trennung der Lichtanteile mindestens ein die Lichtrichtung beeinflussendes optisches Element vorgesehen sind.

3. Fluoreszenzmikroskop nach Anspruch 2, dadurch g e k e n n z e i c h n e t, dass als optisches Element ein Reflexionselement (S1, S2, PS, S), insbesondere ein Spiegel (S), ein Doppelspiegel (S1, S2) oder ein verspiegeltes Prisma (PS), vorgesehen ist.

4. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüch 2 oder 3, dadurch g e k e n n z e i c h n t, dass als optisches Element oder als weiteres optisches Element ein lichtbrechendes Element (P), insbesondere ein unverspiegeltes Prisma (P), in einem Anregungstrahlengang vor dem akustooptischen Element (AOM, AOTF) und/oder in einem Detektionsstrahlung nach dem akustooptischen Element (AOM, AOTF) vorgesehen ist.

5. Fluoreszenzmikroskop, insbesondere konfokales Fluoreszenz-Lasermikroskop,
mit einer Strahlungsquelle (L_1, L_2, L_3),
insbesondere einem Laser, welche Anregungslicht für eine Probe aussendet,
mit einer Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) zum Nachweis von von der Probe ausgesandtem Emissionslicht,
mit einer Mikroskopoptik zum Lenken von Anregungslicht auf die Probe und zum Lenken von Emissionslicht zurück in Richtung Strahlungsquelle und Detektionseinrichtung,
mit einem akustooptischen Element (AOM, AOTF) zur Beugung von Anregungslicht, welches zwischen Strahlungsquelle und Mikroskopoptik so angeordnet ist, dass gebeugtes Anregungslicht in die Mikroskopoptik (SC1, SC2, SCO, M1) einleitbar ist,
- wobei das von der Probe ausgesandte Emissionslicht Anteile von Anregungslicht und Anteile von wellenlängenverschobenem Fluoreszenzlicht aufweist,
- von der Probe ausgesandtes Anregungslicht von der akustooptischen Einrichtung (AOM, AOTF) durch Beugung in Richtung der Strahlungsquelle ablenkbar ist,

- und von der Probe ausgesandtes wellenlängenverschobenes Fluoreszenzlicht ungebeugt durch das akustooptische Element (AOM, AOTF) transmittierbar und räumlich von Anregungslichtanteilen des Emissionslichts trennbar ist und
- wobei die Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) bezüglich des akustooptischen Elements so angeordnet ist, dass ungebeugt durch das akustooptische Element (AOM, AOTF) transmittiertes wellenlängenverschobenes Fluoreszenzlicht mittels der Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) nachweisbar ist,

mit einer Filtereinrichtung (LF), welche zum selektiven Nachweis von wellenlängenverschobenem Fluoreszenzlicht in der Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) zwischen dem akustooptischen Element und der Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) angeordnet ist,
und mit mindestens einem lichtbrechenden Element (P), insbesondere einem unverspiegelten Prisma (P), zur Beeinflussung der Lichtrichtung und zur Trennung der Lichtanteile, welches in einem Anregungsstrahlengang vor dem akustooptischen Element (AOM, AOTF) und/oder in einem Detektionsstrahlengang nach dem akustooptischen Element (AOM, AOTF) angeordnet ist.

6. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch g e k e n n z e i c h n e t, dass in Richtung der Mikroskopoptik (SC1, SC2, SCO, M1) als akustooptische Elemente (AOM, AOTF) zuerst AOM und anschließend AOTF vorgesehen sind.

7. Fluoreszenzmikroskop, insbesondere konfokales Fluoresreszenz-Lasermikroskop,
mit einer Strahlungsquelle (L_1, L_2, L_3),
insbesondere einem Laser, welche Anregungslicht für eine Probe aussendet,

mit einer Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) zum Nachweis von von der Probe ausgesandtem Emissionslicht,
mit einer Mikroskopoptik zum Lenken von Anregungslicht auf die Probe und zum Lenken von Emissionslicht zurück in Richtung Strahlungsquelle und Detektionseinrichtung,
mit einer Mehrzahl von akustooptischen Elementen (AOM, AOTF) zur Beugung von Anregungslicht, welche zwischen Strahlungsquelle und Mikroskopoptik so angeordnet sind, dass gebeugtes Anregungslicht in die Mikroskopoptik (SC1, SC2, SCO, M1) einleitbar ist,

- wobei in Richtung der Mikroskopoptik (SC1, SC2, SCO, M1) als akustooptische Elemente (AOM, AOTF) zuerst AOM und anschließend AOTF angeordnet sind,
- wobei das von der Probe ausgesandte Emissionslicht Anteile von Anregungslicht und Anteile von wellenlängenverschobenem Fluoreszenzlicht aufweist,
- von der Probe ausgesandtes Anregungslicht von den akustooptischen Einrichtungen (AOM, AOTF) durch Beugung in Richtung der Strahlungsquelle ablenkbar ist
- und von der Probe ausgesandtes wellenlängenverschobenes Fluoreszenzlicht ungebeugt durch die akustooptischen Elemente (AOM, AOTF) transmittierbar und räumlich von Anregungslichtanteilen des Emissionslichts trennbar ist und
- wobei die Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) bezüglich der akustooptischen Elemente so angeordnet ist, dass ungebeugt durch die akustooptischen Elemente (AOM, AOTF) transmittiertes wellenlängenverschobenes Fluoreszenzlicht mittels der Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) nachweisbar ist, und

mit einer Filtereinrichtung (LF), welche zum selektiven Nachweis von wellenlängenverschobenem Fluoreszenzlicht in der Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) zwischen den akustooptischen Elementen und der Detektionseinrichtung (DE, DT, NFT) angeordnet ist.

8. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch g e k e n n z e i c h n e t, dass zur Einkopplung des Anregungslichts mindestens eine Glasfaser vorgesehen ist.

9. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch g e k e n n z e i c h n e t, dass in einem Anregungsstrahlengang vor dem akustooptischen Element (AOM, AOTF) und/oder in einem Detektionsstrahlengang nach dem akustooptischen Element (AOM, AOTF) zur verbesserten Trennung der Lichtanteile mindestens ein die Lichtrichtung beeinflussendes optisches Element vorgesehen sind.

10. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch g e k e n n z e i c h n e t,
- dass die Strahlungsquelle (L_1, L_2, L_3) als Mehrzahl von Lasern (L_1, L_2, L_3) unterschiedlicher Wellenlänge ausgebildet ist,
- dass eine Mehrzahl von akustooptischen Elementen (AOM, AOTF) vorgesehen ist, wobei jedem Laser (L_1, L_2, L_3) mindestens ein akustooptisches Element (AOM, AOTF) zugeordnet ist,
- dass die unterschiedlichen Wellenlängen durch Beugung in den jeweiligen akustooptischen Elementen (AOM, AOTF) simultan oder einzeln in einen Mikroskopstrahlengang (SC1, SC2, SCO, M1) einkoppelbar sind und

- dass wellenlängenverschobenes Emissionslicht und Anregungslicht in r jeweils anderen Wellenlänge durch die jeweiligen akustooptischen Elemente (AOM, AOTF) ungebeugt transmittierbar sind.

11. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch g e k e n n z e i c h n e t, dass als akustooptische Elemente AOTF und/oder AOM vorgesehen sind.

12. Fluoreszenzmikroskop nach Anspruch 10, dadurch g e k e n n z e i c h n e t, dass mit dem jeweiligen akustooptischen Element (AOM, AOTF) die Anregungsleistung jedes Lasers (L_1, L_2, L_3) unabhängig einstellbar ist.

13. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch g e k e n n z e i c h n e t, dass die akustooptischen Elemente (AOM, AOTF) durch Frequenzänderung von einer ersten Wellenlänge eines ersten Lasers auf eine zweite Wellenlänge eines zweiten Lasers umschaltbar sind.

14. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch g e k e n n z e i c h n e t, dass das Anregungslicht mittels Beugung an dem akustooptischen Element (AOM, AOTF) in erster Beugungsordnung in die Mikroskopoptik (SC1, SC2, SCO, M1) einleitbar ist.

15. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch g e k e n n z e i c h n e t, dass vor der Mikroskopoptik (SC1, SC2, SCO, M1) ein pinhole (PH) als Anregungs- und Detektionspinhole vorgesehen ist.

16. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 10 bis 15,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t,
dass die Strahlung der Mehrzahl von Lasern (L_1, L_2, L_3) in Richtung der Mikroskopoptik (SC1, SC2, SCO, M1) nacheinander in einer durch abnehmende Wellenlänge gegebenen Reihenfolge in den Mikroskopstrahlengang einkoppelbar ist.

17. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 16,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t,
dass UV-Licht, sichtbares Licht und/oder Infrarotlicht in den Mikroskopstrahlengang einkoppelbar sind.

18. Vorrichtung zur Einkopplung von Licht in einen Strahlengang eines Mikroskops, insbesondere eines konfokalen Fluoreszenz-Lasermikroskops,
mit einer Mehrzahl von Lichtquellen (L_1, L_2, L_3), welche Licht unterschiedlicher Wellenlänge aussenden,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t,
dass eine Mehrzahl von lichtbeugenden Elementen, insbesondere von akustooptischen Elementen (AOM, AOTF), vorgesehen ist,
dass jeder Lichtquelle (L_1, L_2, L_3) mindestens ein lichtbeugendes Element zugeordnet ist, und
dass die unterschiedlichen Wellenlängen durch Beugung in den jeweiligen lichtbeugenden Elementen simultan oder einzeln in einen Mikroskopstrahlengang einkoppelbar sind.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t,
dass AOTF oder AOM als lichtbeugende Elemente vorgesehen sind.

Weber & Heim

Deutsche Patentanwälte
European Patent Attorneys
Euro Trademark Attorneys

Irmgardstrasse 3
D-81479 München
Tel. 089-79 90 47
Fax 089-791 52 56

PCT/EP99/10262
Carl Zeiss
Z 173 - Hm/As

NEUER PATENTANSPRUCH 18

18. Vorrichtung zur Einkopplung von Licht in einen Strahlengang eines Mikroskops, insbesondere eines konfokalen Fluoreszenz-Lasermikroskops,
mit einer Mehrzahl von Lichtquellen (L_1, L_2, L_3), welche Licht unterschiedlicher Wellenlänge aussenden,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t ,
dass eine Mehrzahl von lichtbeugenden Elementen, insbesondere von akustooptischen Elementen (AOM, AOTF), vorgesehen ist,
dass jeder Lichtquelle (L_1, L_2, L_3) mindestens ein lichtbeugendes Element zugeordnet ist,
dass zur Zusammenführung von Licht der Mehrzahl von Lichtquellen (L_1, L_2, L_3) die lichtbeugenden Elemente auf einer gemeinsamen optischen Achse angeordnet sind und
dass die unterschiedlichen Wellenlängen durch Beugung in den jeweiligen lichtbeugenden Elementen simultan oder einzeln in die gemeinsame optische Achse einkoppelbar und in der gemeinsamen optischen Achse zusammenführbar sind.

20. Vorrichtung nach Anspruch 19,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t,
dass in Richtung der Mikroskopoptik (SC1, SC2, SCO, M1)
als akustooptische Elemente (AOM, AOTF) zuerst AOM und
anschließend AOTF vorgesehen sind.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Juni 2000 (29.06.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/37985 A3

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: G02B 21/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/10262

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. Dezember 1999 (22.12.1999)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
198 59 314.7 22. Dezember 1998 (22.12.1998) DE
199 36 573.3 3. August 1999 (03.08.1999) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **CARL ZEISS JENA GMBH** [DE/DE]; Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **WOLLESCHENSKY, Ralf** [DE/DE]; An der Promenade 3, D-99510 Schöten (DE).

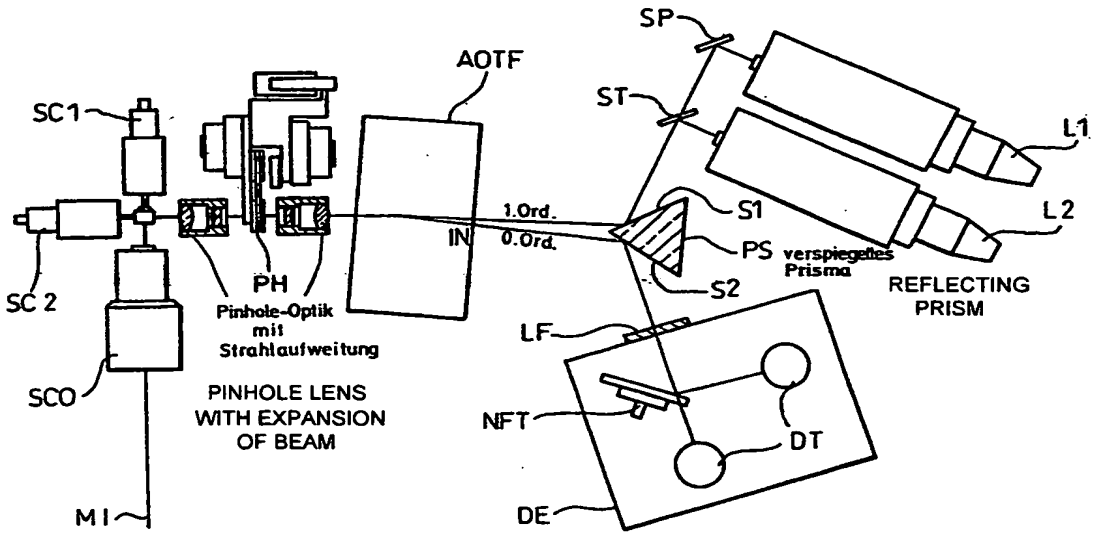
(74) Gemeinsamer Vertreter: **CARL ZEISS JENA GMBH**; Tatzendpromenade 1a, D-07745 Jena (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: JP, US.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: ARRANGEMENT FOR SEPARATING EXCITATION LIGHT AND EMISSION LIGHT IN A MICROSCOPE

(54) Bezeichnung: ANORDNUNG ZUR SEPARIERUNG VON ANREGUNGS- UND EMISSIONSLICHT IN EINEM MIKROSKOP



(57) Abstract: The invention relates to an arrangement of a light diffracting element for separating excitation light and emission light in a microscope beam path, preferably in a confocal microscope, and especially in a laser scanning microscope. According to the invention, the light diffracting element is passed through by both the excitation light as well as by the emission light, and at least one wavelength of the excitation is affected by diffracting, whereas other wavelengths emitted by the sample are passed through without being affected, thus being spatially separated from the excitation light.

(57) Zusammenfassung: Anordnung eines lichtbeugenden Elementes zur Separierung von Anregungs- und Emissionslicht in einem mikroskopischen Strahlengang, vorzugsweise in einem konfokalen Mikroskop, und insbesondere in einem Laser-Scanning-Mikroskop, wobei das lichtbeugende Element sowohl vom Anregungslicht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/37985 A3

(84) **Bestimmungsstaaten** *(regional)*: europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht:
— *Mit internationalem Recherchenbericht.*

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:** 12. April 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

als auch vom Emissionslicht durchlaufen wird und mindestens eine Wellenlänge der Anregung durch Beugung beeinflußt, während andere von der Probe emittierte Wellenlängen das Element unbeeinflußt durchlaufen und dadurch räumlich vom Anregungslicht getrennt werden.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ational Application No
PCT/EP 99/10262

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G02B21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G02B G01N G02F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, PAJ, WPI Data, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 99 42884 A (ENGELHARDT JOHANN ;LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG (DE); BRADL JOACH) 26 August 1999 (1999-08-26) the whole document	1-8,11
X	US 4 627 730 A (JUNGERMAN ROGER L ET AL) 9 December 1986 (1986-12-09) column 3, line 56 -column 5, line 34; figures 1A-1C	1,2,4-6, 11
X	EP 0 503 236 A (IBM) 16 September 1992 (1992-09-16) page 11, line 7 -page 12, line 3; figure 4E	1,2,5,11

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 October 2000	26.10.00

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31–70) 340–3016	Ciarrocca, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 751 417 A (UHL RAINER) 12 May 1998 (1998-05-12) column 5, line 39 -column 6, line 59; figure 1 column 7, line 63 -column 8, line 2	1,4,7
X	EP 0 562 488 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 29 September 1993 (1993-09-29) column 1, line 3 - line 5 column 12, line 35 -column 13, line 18; figure 4	1,2
X	EP 0 620 458 A (NIPPON KOGAKU KK) 19 October 1994 (1994-10-19) page 16, line 17 - last line; figure 13	1,2
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 448 (P-1423), 17 September 1992 (1992-09-17) & JP 04 157413 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD), 29 May 1992 (1992-05-29) abstract	8,11
A	WO 97 30371 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 21 August 1997 (1997-08-21) abstract; figure 1 figures 15,17	1,5,11
X	EP 0 327 425 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 9 August 1989 (1989-08-09) column 5, line 52 - line 60 column 7, line 2 - line 42; figures 5,6	9,11
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 014, no. 059 (P-1000), 2 February 1990 (1990-02-02) & JP 01 282515 A (TOKYO ELECTRON LTD), 14 November 1989 (1989-11-14) abstract	9,11
X	DE 196 33 185 A (LEICA LASERTECHNIK) 23 October 1997 (1997-10-23) column 4, line 40 - line 55; figure 1	9-11
X	DE 197 02 753 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 30 July 1998 (1998-07-30) column 2, line 7 - line 20; figure 1	9,11
X	DE 196 27 568 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 15 January 1998 (1998-01-15) column 6, line 62 -column 7, line 16; figure 2	9

-/—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int· tional Application No
PCT/EP 99/10262

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 148 803 A (SFENA ;AUTOMATES ET AUTOMATISMES SA (FR)) 17 July 1985 (1985-07-17) abstract; figure 1 -----	9,11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP99/10262

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatuonal applicatuon No.
PCT/EP 99/10262

The International Searching Authority found that this international application contains multiple inventions as follows:

1. Claims Nos. 1-8, 11
Arrangement of a light diffracting element for separating excitation light and emission light in a fluorescence microscope

2. Claims Nos 9, 10
Arrangement of several light diffracting elements in a microscopic beam path for coupling different wavelengths.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte. ional Application No
PCT/EP 99/10262

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9942884 A	26-08-1999	DE 19906757 A	02-12-1999
US 4627730 A	09-12-1986	EP 0167410 A	08-01-1986
		JP 61105522 A	23-05-1986
EP 0503236 A	16-09-1992	US 5208648 A	04-05-1993
		JP 1987116 C	08-11-1995
		JP 5157701 A	25-06-1993
		JP 7018806 B	06-03-1995
		US 5220403 A	15-06-1993
US 5751417 A	12-05-1998	DE 19510102 C	02-10-1996
		GB 2299235 A,B	25-09-1996
EP 0562488 A	29-09-1993	JP 6095038 A	08-04-1994
		DE 69315871 D	05-02-1998
		DE 69315871 T	16-04-1998
		DE 562488 T	17-11-1994
		US 5978109 A	02-11-1999
		US 5496995 A	05-03-1996
EP 0620458 A	19-10-1994	JP 7073500 A	17-03-1995
		JP 6088913 A	29-03-1994
		JP 6160718 A	07-06-1994
		US 5452382 A	19-09-1995
		WO 9406041 A	17-03-1994
JP 04157413 A	29-05-1992	NONE	
WO 9730371 A	21-08-1997	US 5841577 A	24-11-1998
		AU 2128697 A	02-09-1997
		EP 0883829 A	16-12-1998
EP 0327425 A	09-08-1989	FR 2626383 A	28-07-1989
		DE 68906040 D	27-05-1993
		DE 68906040 T	14-10-1993
		JP 1245215 A	29-09-1989
		US 4965441 A	23-10-1990
JP 01282515 A	14-11-1989	NONE	
DE 19633185 A	23-10-1997	WO 9739375 A	23-10-1997
		EP 0894278 A	03-02-1999
		JP 2000508438 T	04-07-2000
DE 19702753 A	30-07-1998	NONE	
DE 19627568 A	15-01-1998	NONE	
EP 0148803 A	17-07-1985	FR 2557985 A	12-07-1985
		DE 3568502 D	06-04-1989
		WO 8503141 A	18-07-1985
		FR 2575840 A	11-07-1986
		JP 61502423 T	23-10-1986

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/10262

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G02B21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G02B G01N G02F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, PAJ, WPI Data, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 99 42884 A (ENGELHARDT JOHANN ;LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG (DE); BRADL JOACH) 26. August 1999 (1999-08-26) das ganze Dokument	1-8,11
X	US 4 627 730 A (JUNGERMAN ROGER L ET AL) 9. Dezember 1986 (1986-12-09) Spalte 3, Zeile 56 -Spalte 5, Zeile 34; Abbildungen 1A-1C	1,2,4-6, 11
X	EP 0 503 236 A (IBM) 16. September 1992 (1992-09-16) Seite 11, Zeile 7 -Seite 12, Zeile 3; Abbildung 4E	1,2,5,11

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
4. Oktober 2000	26.10.00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Ciarrocca, M

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 751 417 A (UHL RAINER) 12. Mai 1998 (1998-05-12) Spalte 5, Zeile 39 -Spalte 6, Zeile 59; Abbildung 1 Spalte 7, Zeile 63 -Spalte 8, Zeile 2	1,4,7
X	EP 0 562 488 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 29. September 1993 (1993-09-29) Spalte 1, Zeile 3 - Zeile 5 Spalte 12, Zeile 35 -Spalte 13, Zeile 18; Abbildung 4	1,2
X	EP 0 620 458 A (NIPPON KOGAKU KK) 19. Oktober 1994 (1994-10-19) Seite 16, Zeile 17 - letzte Zeile; Abbildung 13	1,2
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 448 (P-1423), 17. September 1992 (1992-09-17) & JP 04 157413 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD), 29. Mai 1992 (1992-05-29) Zusammenfassung	8,11
A	WO 97 30371 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 21. August 1997 (1997-08-21) Zusammenfassung; Abbildung 1 Abbildungen 15,17	1,5,11
X	EP 0 327 425 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 9. August 1989 (1989-08-09) Spalte 5, Zeile 52 - Zeile 60 Spalte 7, Zeile 2 - Zeile 42; Abbildungen 5,6	9,11
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 014, no. 059 (P-1000), 2. Februar 1990 (1990-02-02) & JP 01 282515 A (TOKYO ELECTRON LTD), 14. November 1989 (1989-11-14) Zusammenfassung	9,11
X	DE 196 33 185 A (LEICA LASERTECHNIK) 23. Oktober 1997 (1997-10-23) Spalte 4, Zeile 40 - Zeile 55; Abbildung 1	9-11
X	DE 197 02 753 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 30. Juli 1998 (1998-07-30) Spalte 2, Zeile 7 - Zeile 20; Abbildung 1	9,11
X	DE 196 27 568 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 15. Januar 1998 (1998-01-15) Spalte 6, Zeile 62 -Spalte 7, Zeile 16; Abbildung 2	9

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Ir ationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/10262

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 148 803 A (SFENA ;AUTOMATES ET AUTOMATISMES SA (FR)) 17. Juli 1985 (1985-07-17) Zusammenfassung; Abbildung 1	9,11

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/10262

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwies n hab n (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkung n hinsichtlich ines Widerspruchs

☐ Di zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☒ Di Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN **PCT/ISA/ 210**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-8,11

 Anordnung eines lichtbeugenden Elementes zur Separierung von Anregungs- und Emissionslicht in einem Fluoreszenzmikroskop

2. Ansprüche: 9,10

 Anordnung mehrerer lichtbeugender Elemente in einem mikroskopischen Strahlengang zur Einkopplung unterschiedlicher Wellenlängen

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In tionales Aktenzeichen
PCT/EP 99/10262

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der V röffentlichung
WO 9942884 A	26-08-1999	DE 19906757 A	02-12-1999
US 4627730 A	09-12-1986	EP 0167410 A	08-01-1986
		JP 61105522 A	23-05-1986
EP 0503236 A	16-09-1992	US 5208648 A	04-05-1993
		JP 1987116 C	08-11-1995
		JP 5157701 A	25-06-1993
		JP 7018806 B	06-03-1995
		US 5220403 A	15-06-1993
US 5751417 A	12-05-1998	DE 19510102 C	02-10-1996
		GB 2299235 A,B	25-09-1996
EP 0562488 A	29-09-1993	JP 6095038 A	08-04-1994
		DE 69315871 D	05-02-1998
		DE 69315871 T	16-04-1998
		DE 562488 T	17-11-1994
		US 5978109 A	02-11-1999
		US 5496995 A	05-03-1996
EP 0620458 A	19-10-1994	JP 7073500 A	17-03-1995
		JP 6088913 A	29-03-1994
		JP 6160718 A	07-06-1994
		US 5452382 A	19-09-1995
		WO 9406041 A	17-03-1994
JP 04157413 A	29-05-1992	KEINE	
WO 9730371 A	21-08-1997	US 5841577 A	24-11-1998
		AU 2128697 A	02-09-1997
		EP 0883829 A	16-12-1998
EP 0327425 A	09-08-1989	FR 2626383 A	28-07-1989
		DE 68906040 D	27-05-1993
		DE 68906040 T	14-10-1993
		JP 1245215 A	29-09-1989
		US 4965441 A	23-10-1990
JP 01282515 A	14-11-1989	KEINE	
DE 19633185 A	23-10-1997	WO 9739375 A	23-10-1997
		EP 0894278 A	03-02-1999
		JP 2000508438 T	04-07-2000
DE 19702753 A	30-07-1998	KEINE	
DE 19627568 A	15-01-1998	KEINE	
EP 0148803 A	17-07-1985	FR 2557985 A	12-07-1985
		DE 3568502 D	06-04-1989
		WO 8503141 A	18-07-1985
		FR 2575840 A	11-07-1986
		JP 61502423 T	23-10-1986

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:
G02B 21/00	A1	WO 99/42884
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. August 1999 (26.08.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00459

(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Februar 1999 (19.02.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 06 867.0 19. Februar 1998 (19.02.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG GMBH [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 518, D–69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: ENGELHARDT, Johann [DE/DE]; Schiessmauerweg 6, D–76669 Bad Schönborn (DE). BRADL, Joachim [DE/DE]; Max–Planck–Strasse 33, D–69198 Schriesheim (DE). ULRICH, Heinrich [DE/DE]; Langgewann 2, D–69121 Heidelberg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

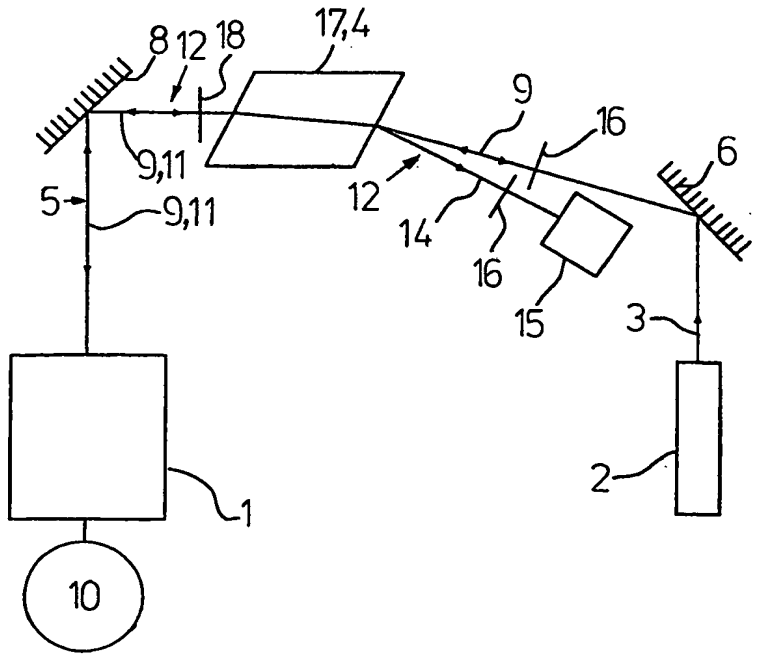
Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: OPTICAL ARRANGEMENT WITH A SPECTRALLY SELECTIVE ELEMENT

(54) Bezeichnung: OPTISCHE ANORDNUNG MIT SPEKTRAL SELEKTIVEM ELEMENT

(57) Abstract

The invention relates to an optical arrangement which is situated in the beam path of a light source suited for fluorescence activation, preferably in the beam path of a confocal laser scanning microscope. The inventive optical arrangement comprises at least one spectrally selective element (4) for injecting the activation light (3) of at least one light source (2) in the microscope and for extracting the activation light (3) or the activation wavelength, said activation light or activation wavelength being scattered and reflected on the object, from the light (13) coming from the object (10) via the detection beam path (12). In order to provide an optical arrangement having a variable arrangement with the simplest construction, activation light (3, 9) of different wavelengths can be extracted by the spectrally selective element (4). Alternatively, such an optical arrangement is characterized in that the spectrally selective element (4) can be adjusted to the activation wavelength which is to be extracted.



(57) Zusammenfassung

Eine optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser–Scanning–Mikroskops, mit mindestens einem spektral selektiven Element (4) zum Einkoppeln des Anregungslichts (3) mindestens einer Lichtquelle (2) in das Mikroskop und zum Ausblenden des am Objekt gestreuten und reflektierten Anregungslichts (3) bzw. der Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang (12) vom Objekt (10) kommenden Licht (13), ist zur variablen Ausgestaltung bei einfachster Konstruktion dadurch gekennzeichnet, daß durch das spektral selektive Element (4) Anregungslicht (3, 9) unterschiedlicher Wellenlängen ausblendbar ist. Alternativ ist eine s lche optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, daß das spektral selektive Element (4) auf die auszublendene Anregungswellenlänge einstellbar ist.

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

OPTISCHE ANORDNUNG MIT SPEKTRAL SELEKTIVEM ELEMENT

Die Erfindung betrifft eine optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, mit mindestens einem spektral selektiven Element zum Einkoppeln des Anregungslichts mindestens einer Lichtquelle in das Mikroskop und zum Ausblenden des am Objekt gestreuten und reflektierten Anregungslichts bzw. der Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang vom Objekt kommenden Licht.

Sowohl bei der konventionellen wie auch bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie werden in den Strahlengang einer für Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle Farbstrahlteiler mit einer ganz besonderen Transmissions- und Reflexionscharakteristik verwendet. Dabei handelt es sich ganz überwiegend um dichroitische Strahlteiler. Mit einem solchen Element wird die Fluoreszenzanregungswellenlänge λ_{ill1} (bzw. λ_{ill2} , λ_{ill3} ..., λ_{illn} bei der Verwendung von mehreren Lasern) in den Beleuchtungsstrahlengang reflektiert, um die Fluoreszenzverteilung im Objekt anzuregen und dann zusammen mit dem am Objekt gestreuten und reflektierten Anregungslicht den Strahlengang bis hin zum Farbstrahlteiler zu durchlaufen. Das Anregungslicht mit den Wellenlängen λ_{ill1} , λ_{ill2} , λ_{ill3} , ... , λ_{illn} wird am Farbstrahlteiler zurück in den Laser reflektiert, nämlich aus dem Detektionsstrahlengang heraus. Das Fluoreszenzlicht mit den Wellenlängen λ_{fluo1} , λ_{fluo2} , λ_{fluo3} ,..., λ_{fluon} passiert den Farbstrahlteiler und wird – gegebenenfalls nach weiterer spektraler Aufteilung – detektiert.

Farbstrahlteiler sind üblicherweise durch ein Interferenzfilter realisiert und werden je nach den verwendeten Wellenlängen für die Anregung bzw. für die Detektion gezielt bedampft. An dieser Stelle sei angemerkt, daß gemäß voranstehender Beschreibung des Standes der Technik unter einem Dichroit ein Wellenlängen-separierbares Element verstanden wird, welches das Licht unterschiedlicher Wellenlänge aufgrund der Wellenlänge und nicht aufgrund der Polarisation trennt.

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

In der Praxis ist die Verwendung von Farbstrahlteilern zunächst einmal insoweit nachteilig, als es sich hierbei um in der Herstellung aufwendige und daher teure optische Bausteine handelt. Des weiteren ist nachteilig, daß Farbstrahlteiler eine feste Wellenlängencharakteristik aufweisen und daher nicht mit beliebiger Flexibilität hinsichtlich der Wellenlänge des Anregungslichts verwendet werden können. Bei einem Wechsel der Wellenlänge des Anregungslichts müssen auch die Farbstrahlteiler ausgewechselt werden, so beispielsweise bei einer Anordnung mehrerer Farbstrahlteiler in einem Filterrad. Dies ist abermals aufwendig und daher teuer und erfordert im übrigen eine ganz besondere Justage der einzelnen Farbstrahlteiler.

Die Verwendung eines Farbstrahlteilers bringt den weiteren Nachteil mit sich, daß durch Reflexion bedingte Lichtverluste auftreten, insbesondere Lichtverluste von Fluoreszenzlicht, welches gerade detektiert werden soll. Der spektrale Transmissions-/Reflexionsbereich ist bei Farbstrahlteilern recht breit ($\lambda_{ill} \pm 20$ nm) und keineswegs ideal „steil". Folglich läßt sich das Fluoreszenzlicht aus diesem spektralen Bereich nicht ideal detektieren.

Bei Verwendung von Farbstrahlteilern ist die Anzahl der gleichzeitig einkoppelbaren Laser begrenzt, nämlich beispielsweise auf die Anzahl der in einem Filterrad angeordneten und kombinierbaren Farbstrahlteiler. Üblicherweise werden maximal drei Laser in den Strahlengang eingekoppelt. Wie bereits zuvor ausgeführt, müssen sämtliche Farbstrahlteiler, also auch die in einem Filterrad angeordneten Farbstrahlteiler, exakt justiert werden, was einen ganz erheblichen Aufwand in der Handhabung mit sich bringt. Alternativ können geeignete Neutralstrahlteiler eingesetzt werden, die das Fluoreszenzlicht gemeinsam mit dem am Objekt gestreuten/reflektierten Anregungslicht effizient zum Detektor leiten. Die Verluste bei der Lasereinkopplung sind dabei jedoch erheblich.

Zur Dokumentation des Standes der Technik wird lediglich beispielhaft auf die DE 196 27 568 A1 verwiesen, die eine optische Anordnung zur konfokalen Mikroskopie zeigt. Dabei handelt es sich im Konkreten um eine Anordnung zur zeitgleichen konfokalen Beleuchtung einer Objektebene mit einer Vielzahl

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

geeignet divergierender Leuchtpunkte sowie zugehörigen Abbildungsgliedern und einer Vielzahl von Pinholes zur konfokalen kontrastreichen Abbildung in einem Beobachtungsgerät, wobei es sich dabei um ein Mikroskop handeln kann. Die Einkopplung mehrerer Lichtquellen erfolgt dort über ein diffraktives Element. Mehrere optische Teilerelemente bzw. Farbstrahlteiler sind im Detektionsstrahlengang angeordnet, wodurch sich ein ganz erheblicher apparativer Aufwand ergibt.

Hinsichtlich der Verwendung aktiver optischer Elemente im Strahlengang eines Laser-Scanning-Mikroskops wird ergänzend auf die US 4,827,125 und die US 5,410,371 verwiesen, wobei diese Druckschriften die grundsätzliche Verwendung eines AOD (Acousto-Optical-Deflector) und eines AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) zeigen, und zwar stets mit dem Zweck, einen Strahl abzulenken oder abzuschwächen.

Der vorliegenden Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, eine optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, derart auszugestalten und weiterzubilden, daß das Einkoppeln des Anregungslichts unterchiedlicher Anregungswellenlänge möglich ist, ohne bei einem Wechsel der Wellenlänge des Anregungslichts einen Wechsel oder eine besondere Justage der dort verwendeten optischen Elemente vornehmen zu müssen. Des weiteren soll die Anzahl der erforderlichen optischen Elemente weitestmöglich reduziert sein. Schließlich soll eine ideale Detektion des Fluoreszenzlichts möglich sein.

Die erfindungsgemäße optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale der nebengeordneten Patentansprüche 1 und 2. Danach ist eine gattungsgemäße optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, daß durch

das spektral selektive Element Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlängen ausblendbar sowie entsprechend einkoppelbar ist. Alternativ ist die optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, daß das spektral selektive Element auf die auszublendende Anregungswellenlänge einstellbar ist.

Erfindungsgemäß ist erkannt worden, daß man im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, insbesondere im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, den dort bislang verwendeten Farbstrahlteiler durch ein ganz besonderes spektral selektives Element ersetzen kann, nämlich durch ein spektral selektives Element, welches geeignet ist, Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlängen auszublenden oder einzublenden bzw. einzukoppeln. Dieses spektral selektive Element dient einerseits zum Einkoppeln des Anregungslichts mindestens einer Lichtquelle in das Mikroskop und andererseits zum Ausblenden des am Objekt gestreuten und reflektierten Anregungslichts bzw. der entsprechenden Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang vom Objekt kommenden Licht. Insoweit kommt dem spektral selektiven Element eine Doppelfunktion zu, wobei beide Funktionen quasi zwangsgekoppelt sind.

Alternativ zu der Fähigkeit des spektral selektiven Elements, Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlängen ausblenden zu können, ist das spektral selektive Element auf die jeweils einzublendende oder auszublendende Anregungswellenlänge einstellbar ist. Auch insoweit ist aufgrund der voranstehend geschilderten Doppelfunktion eine Zwangskopplung auf einfache Weise gewährleistet, nämlich dadurch, daß mit Hilfe des spektral selektiven Elements das Anregungslicht in den Beleuchtungsstrahlengang einkoppelbar und daß exakt die Wellenlänge des Anregungslichts, nämlich die Anregungswellenlänge, aufgrund der hier vorgesehenen Einstellbarkeit aus dem über den Detektionsstrahlengang vom Objekt kommenden Licht ausblendbar ist, so daß zur Detektion das vom Objekt kommende Detektionslicht (=Fluoreszenzlicht) verbleibt.

In vorteilhafter Weise kann es sich bei dem spektral selektiven Element – zur Begünstigung der voranstehend erörterten Doppelfunktion – um ein passives

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

Element bzw. Bauteil handeln. Dazu könnte das spektral selektive Element als transparentes optisches Gitter oder als holographisches Element ausgeführt sein. Ebenso ist es denkbar, das spektral selektive Element als passiven AOD (Acousto-Optical-Deflecor) oder als passiven AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) auszuführen.

In ganz besonders vorteilhafter Weise, nämlich zur konkreten Realisierung der Einstellbarkeit des spektral selektiven Elements auf die auszublendende Anregungswellenlänge, kann es sich bei dem spektral selektiven Element um ein aktives Bauteil handeln, so bspw. um ein akustooptisch und/oder elektrooptisch arbeitendes Element. Im Konkreten kommt hier als spektral selektives Element ein AOD (Acousto-Optical-Deflector) oder ein AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) in Frage.

Anstelle des im Stand der Technik üblichen Farbstrahlteilers wird hier ein aktives spektral selektives Element verwendet, so beispielsweise ein AOD oder ein AOTF. Die Aufgabe dieser aktiven Bauteile besteht darin, das Anregungslicht der Lichtquelle bzw. des Lasers oder der Laser λ_{ill1} , λ_{ill2} , λ_{ill3} ,...., λ_{illn} in den Beleuchtsstrahlengang und somit in das Mikroskop einzukoppeln, um danach per Beam-Scanning die Fluoreszenzverteilung im Objekt anzuregen. Bei der Detektion kann das vom Objekt kommende Fluoreszenzlicht nahezu ungestört das aktive spektral selektive Element passieren. Dabei wird das vom Objekt gestreute oder reflektierte Licht mit den Anregungswellenlängen der Lichtquelle bzw. des Lasers oder der Laser aus dem Detektionsstrahlengang weitgehend herausreflektiert.

Zur Einkopplung einer Lichtquelle bzw. eines Lasers oder mehrerer Laser mit verschiedenen Wellenlängen λ_{ill1} , λ_{ill2} ,..., λ_{illn} kann ein AOD mit entsprechenden Frequenzen ν_1 , ν_2 ,..., ν_n vorzugsweise simultan beschaltet werden, so daß die verschiedenen Laserstrahlen nach dem Durchgang durch den AOD koaxial mit der optischen Achse verlaufen. Hinsichtlich der Verwendung des AOD ist wesentlich, daß dort eine Frequenz ν_n eine Wellenlänge λ_{illn}, selektiert, die aus dem eigentlichen Strahlengang abgelenkt wird. Der Ablenkungswinkel ϕ ist dabei durch die Formel

$$\phi = \lambda_{illn} \nu_n / 2f$$

definiert, wobei f die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Schallwelle im AOD ist. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht mit einer spektralen Verteilung um die Wellenlängen λ_{fluo1} , λ_{fluo2} ,..., λ_{fluon} zusammen mit dem am Objekt gestreuten bzw. reflektierten Anregungslicht mit den Wellenlängen λ_{ill1} , λ_{ill2} ,..., λ_{illn} durchläuft nun den AOD in umgekehrter Richtung. Jedoch wird gemäß der Umkehrbarkeit des Lichtwegs das Anregungslicht mit den Wellenlängen λ_{ill1} , λ_{ill2} ,..., λ_{illn} wegen der spezifischen Einstellung des AOD aus dem Detektionsstrahlengang in Richtung des Lasers abgelenkt (1. Ordnung). Somit kann das „spektral verbleibende" Fluoreszenzlicht um die Wellenlängen λ_{fluo1} , λ_{fluo2} ,..., λ_{fluon} - verglichen mit einem herkömmlichen Farbstrahlteiler - auf verbesserte Weise detektiert werden (0. Ordnung). Dadurch läßt sich jedenfalls die Justage der Einkopplung unterschiedlicher Laser einfacher als im Stand der Technik (dort unter Anwendung herkömmlicher Farbstrahlteiler in einem Filterrad) vornehmen.

In weiter vorteilhafter Weise könnte ein Nachschalten weiterer AOTF die einzelnen Wellenlängen in ihrer Leistung nach der Strahlzusammenführung selektiv regeln.

Zur Einkopplung einer Laserlichtquelle mit verschiedenen Wellenlängen λ_{fill1} , λ_{fill2} ,..., λ_{filln} kann ein AOTF mit entsprechenden Frequenzen ν_1 , ν_2 ,..., ν_n simultan geschaltet sein, so daß die verschiedenen Wellenlängen in ihrer Anregungsleistung variieren und auf die Anwendung hin optimierbar sind. Die Zuführung des Laserlichts kann mittels Lichtleitfaser erfolgen.

Jedenfalls wird die Lichtquelle bzw. der Laser koaxial aus der Richtung der 1. Ordnung des Kristalls eingekoppelt. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht mit einer spektralen Verteilung um die Wellenlängen λ_{fluo1} , λ_{fluo2} ,..., λ_{fluon} gemeinsam mit dem am Objekt gestreuten bzw. reflektierten Anregungslicht mit den Wellenlängen λ_{fill1} , λ_{fill2} ,..., λ_{filln} durchlaufen nun den AOTF in umgekehrte Richtung. Gemäß der Umkehrbarkeit des Lichtwegs wird das Anregungslicht mit den Wellenlängen λ_{fill1}, λ_{fill2} ,..., λ_{filln} wegen der spezifischen Einstellung des

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

AOTF aus dem Detektionsstrahlengang in Richtung der Lichtquelle bzw. des Lasers abgelenkt. Somit kann auch hierbei das „spektral verbleibende" Fluoreszenzlicht um die Wellenlängen λ_{fluo1} , λ_{fluo2} ,..., λ_{fluon} in einer – verglichen zum herkömmlichen Farbstrahlteiler – verbesserten Weise detektiert werden (0. Ordnung).

Sowohl unter Verwendung eines AOD oder AOTF als auch unter Verwendung eines transparenten Gitters wird sich das Fluoreszenzlicht nach dem Duchgang durch das jeweilige aktive Element aufgrund der auftretenden Dispersion spektral auffächern. Insoweit ist es von Vorteil, ein oder mehrere entsprechende „inverse" Elemente nachzuschalten, so daß die ungewünschte spektrale Auffächerung wieder rückgängig gemacht wird. Auch ist es denkbar, weitere optische Elemente zur Fokussierung oder zum Ausblenden unerwünschter Strahlanteile dem jeweiligen Element (AOD, AOTF oder transparentes Gitter) vor- bzw. nachzuschalten. Der dadurch wiedervereinigte Detektionsstrahl kann dann in herkömmlicher Weise durch nachgeschaltete Farbstrahlteiler spektral zerlegt und auf die verschiedenen Detektoren abgebildet werden.

Grundsätzlich ist eine Anordnung im Sinne eines „Multibanddetektor" denkbar. Hierzu wird auf die Patentanmeldung DE 43 30 347.1-42 verwiesen, deren Inhalt hier ausdrücklich hinzugezogen und insoweit als bekannt vorausgesetzt wird. Zwischen der Scan-Einheit und dem AOD bzw. dem transparenten Gitter (bei mehreren Lichtquellen bzw. Lasern mehrerer Wellenlängen) bzw. dem AOTF (bei einer Lichtquelle bzw. einem Laser mit verschiedenen Wellenlängen) ist das Anregungs-Pinhole angeordnet, wobei dieses identisch mit dem Detektions-Pinhole ist. In vorteilhafter Weise wird dabei die Eigenschaft des Kristalls, den Lichtstrahl der 0. Ordnung durch den Prismeneffekt spektral aufzufächern, zur Detektion genutzt. Das dispersive Element des Multibanddetektors ist dabei mit dem Farbstrahlteiler zu einem Bauteil vereinigt, wodurch alle weiteren, dem herkömmlichen Detektionsstrahlengang nachgeordneten und mit weiteren Verlusten in der Fluoreszenzintensität behafteten Farbstrahlteiler entfallen.

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

In ganz besonders vorteilhafter Weise kann die voranstehend erörterte Technik in Kombination mit einer in der Wellenlänge variabel durchstimmbaren Laserlichtquelle - z.B. Farbstofflaser, OPO (optisch parametrisierter Oszillator), Elektronenstrahlkollisionslichtquelle - äußerst flexible Fluoreszenzmikroskopie-Anwendungen ermöglichen. Die Einstellung bzw. Kontrolle der Anregungswellenlänge kann direkt mit der Ansteuereinheit eines der zuvor beschriebenen spektral selektiven Elemente gekoppelt sein, so daß nur diese Anregungswellenlänge koaxial in den Anregungsstrahlengang des Mikroskops eingekoppelt und wiederum nur diese Wellenlänge aus dem Detektionsstrahlengang ausgeblendet wird. Die Kopplung bzw. Zwangskopplung der Lichtquelle mit dem strahlteilenden Element kann entweder manuell oder automatisch oder gar nach einer vorgebbaren Vorschrift erfolgen, wobei diese Möglichkeit dem jeweiligen Anforderungsprofil anzupassen ist. beispielsweise kann nach jeder gescannten Bildebene die Anregungswellenlänge sowie der Strahlteiler in geeigneter Weise verändert werden. Somit lassen sich Mehrfarbenfluoreszenzobjekte detektieren. Eine zeilenweise Umschaltung ist ebenso denkbar.

Zusammenfassend lassen sich die Vorteile der erfindungsgemäßen Lehre nebst vorteilhafter Ausgestaltung wie folgt zusammenfassen:

Die spektral selektiven Elemente sind für alle Wellenlängen außer für die selektierten Anregungswellenlängen λ_{ill1} , λ_{ill2} , ... λ_{illn} „transparent". Der „spektrale Verlust" ist minimal, da vom spektral selektiven Element nur der selektierte spektrale Bereich von typischerweise $\lambda_{illn} \pm 2$ nm abgelenkt wird. Dadurch wird der spektrale Bereich für die Detektion vergrößert. Somit können nahezu beliebig viele unterschiedliche Wellenlängenbereiche simultan eingekoppelt und genutzt werden. Die spektral „verlorene Fluoreszenzintensität", die durch die spektral selektiven Elemente bedingt ist, ist geringer als bei herkömmlichen Farbstrahlteilern. Mit anderen Worten liegen hier reduzierte Intensitätsverluste im interessierenden Bereich vor. Die aktiven spektral selektiven Elemente sind flexibel einstellbar, so daß prinzipiell beliebig viele Lichtquellen bzw. Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen auch simultan in das Mikroskop einkoppelbar sind. Dies ermöglicht die verbesserte

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

Anwendung bei Multi-Color FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung). Folglich ist dann nur noch eine Limitierung der spektralen Aufspaltung desFluoreszenzlichts, bspw. durch „Cross-Talk", gegeben. Herkömmliche Sperrfilter können komplett entfallen, so daß weitere Verluste von Fluoreszenzlicht in der Detektion vermieden sind.

Schließlich ist es auch denkbar, daß ein anderes aktives holographisches Element dem spektral selektiven Element nachgeschaltet ist und dabei die Aufgabe des Strahlscanners ausübt. Beide Elemente können zu einem einzigen Bauteil zusammengefaßt sein.

Grundsätzlich lassen sich unterschiedliche Lichtquellen verwenden, solange sie zur Fluoreszenzanregung geeignet sind. So kommt bspw. eine Weißlichtquelle, eine Lichtquelle zur Verwendung eines optisch parametrisierten Oszillators, eine Elektronenstrahlkollisionslichtquelle oder eine Laserlichtquelle in Frage, wobei die Laserlichtquelle in der Wellenlänge variabel durchstimmbar sein kann. Laserlichtquellen mit verschiedenen Wellenlängen oder eine mehrere Laser umfassende Lichtquelle ist bzw. sind verwendbar.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die den Patentansprüchen 1 und 2 nachgeordneten Patentansprüche, andererseits auf die nachfolgende Erläuterung bevorzugter Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigen

Fig. 1 in einer schematischen Darstellung eine gattungsbildende optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops zur Dokumentation des der Erfindung zu grundeliegenden Standes der Technik,

Fig. 2 in einer schematischen Darstellung ein erstes Ausführungsbei

Fig. 3 in einer schematischen Darstellung ein zweites Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, wobei dort drei Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen einkoppelbar sind,

Fig. 4 in einer schematischen Darstellung ein drittes Ausführungsbespiel einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, wobei dort die Einkopplung von drei Laserlichtquellen über ein transparentes Gitter erfolgt,

Fig. 5 in schematischer Darstellung, vergrößert und teilweise, den Beleuchtungsstrahlengang und Detektionsstrahlengang, wobei dem aktiven spektral selektiven Element zur Strahlzusammenführung dienende Mittel nachgeschaltet sind,

Fig. 6 in schematischer Darstellung, vergrößert und teilweise, den Beleuchtungsstrahlengang und Detektionsstrahlengang, wobei dort eine Dispersionskorrektur erfolgt,

Fig. 7 in einer schematischen Darstellung die prinzipielle Funktionsweise eines AOD oder AOTF,

Fig. 8 in einer schematischen Darstellung ein weiteres Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung, wobei dort eine zusätzliche spektrale Auffächerung vor einem Multibanddetektor stattfindet und

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

Fig. 9 in einer schematischen Darstellung das Ausführungsbeispiel aus Fig. 8, wobei dort im Detektionsstrahlengang vor dem Multibanddetektor ein variables Spaltfilter angeordnet ist.

Fig. 1 dokumentiert den Stand der Technik und zeigt dabei eine herkömmliche optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, wobei es sich hier um eine optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops handelt. Der Laserscanner 1 ist dabei lediglich symbolisch dargestellt. Bei der den Stand der Technik betreffenden Darstellung sind als Lichtquellen insgesamt drei Laser 2 vorgesehen, die mit ihrem Anregungslicht 3 über spektral selektive Elemente 4 in den Beleuchtungsstrahlengang 5 des Mikroskops einkoppeln. Bei den spektral selektiven Elementen 4 handelt es sich im Konkreten um einen Spiegel 6 sowie um Farbstrahlteiler 7. Jedenfalls wird das Anregungslicht 3 in den Beleuchtungsstrahlengang 5 eingekoppelt und gelangt über einen weiteren Spiegel 8 als Anregungslicht 9 zum Laserscanner 1.

Das von dem ebenfalls lediglich symbolisch dargestellten Objekt 10 zurückkommende Licht – hier handelt es sich um das am Objekt gestreute und reflektierte Anregungslicht 9 einerseits und um das vom Objekt 10 ausgesandte Fluoreszenzlicht 11 – gelangt über den Spiegel 8 zu dem spektral selektiven Element 4, wobei es sich hier um den Farbstrahlteiler 7 handelt. Von dort aus wird das Anregungslicht 9 bzw. die Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang 12 vom Objekt 10 kommenden Licht 13 ausgeblendet und gelangt als zurückkommendes Anregungslicht 9 zurück zu den Lasern 2. Das durch den Farbstrahlteiler 7 nicht abgelenkte Detektionslicht 14 gelangt unmittelbar zu dem Detektor 15.

Erfindungsgemäß ist durch das spektral selektive Element 4 zurückkommendes Anregungslicht 3 unterschiedlicher Wellenlängen ausblendbar. Dies ist insbesondere in Fig. 4 dargestellt.

Alternativ – in ebenfalls erfindungsgemäßer Weise – ist das spektral selektive Element 4 auf die auszublendende Anregungswellenlänge einstellbar. Dies läßt sich den Ausführungsbeispielen aus den Fig. 2, 3 und 8, 9 besonders gut entnehmen.

Bei dem in Fig. 2 gezeigten Ausführungsbeispiel ist lediglich ein Laser 2 vorgesehen, dessen Anregungslicht 3 unterschiedliche Wellenlängen aufweisen kann. Jedenfalls gelangt das Anregungslicht 3 über einen Spiegel 6 und über ein zusätzliches optisches Element, nämlich über eine Linse 16 zu einem AOTF 17, der als spektralselektives Element arbeitet. Von dort aus gelangt das Anregungslicht 3 wiederum über ein zusätzliches optisches Element - im hier gewählten Ausführungsbeispiel eine Linse 18 - und über einen Spiegel 8 zum Laserscanner 1. Vom Objekt 10 reflektiert, gelangt das zurückkommende Licht – reflektiertes Anregungslicht 9 und Detektionslicht 11 – über den Spiegel 8 und die Linse 18 zurück in den AOTF 17 und wird dort entsprechend der Beschaltung des AOTF 17 teilweise ausgeblendet. Im Konkreten wird nämlich das Detektionslicht bzw. Fluoreszenzlicht 11 über den Detektionsstrahlengang 12 zum Detektor 15 geführt (0. Ordnung). Das zurückkommende Anregungslicht 9 wird dagegen über die Linse 16 und den Spiegel 6 zurück zum Laser 2 geführt und ist somit aus dem Detektionsstrahlengang 12 ausgeblendet.

Ähnlich verhält es sich bei dem in Fig. 3 gezeigten Ausführungsbeispiel, wobei dort gleichzeitig drei Laser 2 über zusätzliche optische Elemente, hier Linsen 16, ihr Anregungslicht 3 über ein AOD 19, eine weitere nachgeschaltete Linse 18 und einen Spiegel 8 in den Beleuchtungsstrahlengang 5 einkoppeln. Von dort aus gelangt das Anregungslicht 3 zum Laserscanner 1 und zum Objekt 10.

Das vom Objekt kommende Licht 13 umfaßt bei dem voranstehend genannten Ausführungsbeispiel Fluoreszenzlicht 11 und zurückkommendes Anregungslicht 9, wobei dort der AOD 19 das zurückkommende Fluoreszenzlicht als Detektionslicht 14 zu dem Detektor 15 führt. Das zurückkommende Anregungslicht 9 wird ausgeblendet und gelangt über Linsen 16 zu den jeweiligen Lasern 2.

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

Das in Fig. 4 gezeigte Ausführungsbeispiel umfaßt als spektral selektives Element 4 ein transparentes Gitter 20, wobei über das transparente Gitter 20 gleichzeitig drei Laser 2 ihr Anregungslicht 3 in den Beleuchtungsstrahlengang 5 des Mikroskops einkoppeln. Wesentlich ist hier jedenfalls, daß das transparente Gitter 20 das vom Objekt 10 zurückkommende Anregungslicht 9 aus dem

Detektionsstrahlengang ausblendet, so daß dieses Licht zurück zu den Lasern 2 gelangt. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht 11gelangt über den Detektionsstrahlengang 12 zum Detektor 15.

Fig. 5 zeigt die Möglichkeit einer Dispersionskorrektur, wobei das vom Objekt zurückkomende Licht 13 in den AOTF 17 oder AOD 19 gelangt. Dort wird das zurückkommende Detektionslicht 14 – zwangsweise – spektral aufgefächert und über nachgeschaltete Elemente – AOD/AOTF – parallelisiert und schließlich konvergiert. Das spektral vereinigte Detektionslicht 14 gelangt von dort zu dem in Fig. 5 nicht gezeigten Detektor 15.

Bei der in Fig. 6 gezeigten Dispersionskorrektur wird das vom Objekt kommende Licht 13 mittels AOD 17/ AOTF 19 aufgefächert, wobei das aufgefächerte Detektionslicht 14 über ein weiteres passives spektral selektives Element 4 – AOTF 17 oder AOD 19 – über eine Linse 21 mit Feldkorrektur konvertiert und durch ein Detektionspinhole 22 oder durch einen Detektionsspalt zum Detektor 15 gelangt.

Gemäß der Darstellung in Fig. 7 handelt es sich bei dem spektral selektiven Element 4 um ein AOTF 17 oder ein AOD 19, wobei diese Elemente einen speziellen Kristall mit dispersionsfreier 0. Ordnung umfassen. Dieser Kristall bzw. dieses spektral selektive Element wird über ein Piezoelement 23 angeregt bzw. beaufschlagt. Fig. 7 zeigt besonders deutlich, daß das vom Objekt kommende Licht 13 in dem AOTF 17 bzw. AOD 19 aufgespalten wird, wobei das Detektionslicht 14 als dispersionsfreies Licht 0. Ordnung ungehindert durch den Kristall läuft. Das vom Objekt zurückkommende Anregungslicht 9 wird dagegen als Licht 1. Ordnung abgelenkt und zurück zu den hier nicht gezeigten

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

Lasern geführt.

Fig. 8 zeigt eine spezielle Detektion unter Ausnutzung der spektralen Auffächerung des spektral selektiven Elements 4, wobei hier im Konkreten ein AOTF 17 verwendet ist. Das vom Objekt 10 kommende Licht 13 wird im AOTF 17 spektral aufgespalten, wobei das Detektionslicht 14 über eine Linse 16 und einen Spiegel 6 zu einem Multibanddetektor 24 bzw. Spektrometer gelangt. Der Spiegel 6 führt zu einer Verlängerung der Strecke, so daß eine Auffächerung des zurückkomenden Detektionslichts 14 bis hin zum Multibanddetektor 24 begünstigt wird.

Das im AOTF 17 ausgeblendete Anregungslicht 9 gelangt über die Linse 16 und den Spiegel 8 zurück zum Laser 2.

Schließlich zeigt Fig. 9 in einer schematischen Darstellung das Ausführungsbeispiel aus Fig. 8, wobei dort - in Ergänzung - im Detektionsstrahlengang vor dem Multibanddetektor 24 ein variables Spaltfilter 25 angeordnet ist. Dieses Spaltfilter 25 ist im Detektionsstrahlengang 12 unmittelbar vor dem Detektor 15 angeordnet und im Detektionsstrahlengang positionierbar. Desweiteren ist der Spalt 26 des Spaltfilters 25 variabel, so daß auch insoweit eine spektrale Selektion des Detektionslichts 14 möglich ist.

Hinsichtlich weiterer Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Lehre, die den Figuren nicht zu entnehmen sind, wird zur Vermeidung von Wiederholungen auf den allgemeinen Teil der Beschreibung und die dort geschilderte Funktionsweise der Lehre und der vorteilhaften Ausgestaltungen verwiesen.

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

Bezugszeichenliste

1	Laserscanner
2	Laser (Lichtquelle)
3	Anregungslicht
4	spektral selektives Element
5	Beleuchtungsstrahlengang
6	Spiegel
7	Farbstrahlteiler
8	Spiegel
9	Anregungs- und Detektionslicht
10	Objekt
11	Fluoreszenzlicht (Detektionslicht)
12	Detektionsstrahlengang
13	(vom Objekt kommendes) Licht
14	Detektionslicht (nicht abgelenktes Detektionslicht)
15	Detektor
16	Linse
17	AOTF
18	Linse
19	AOD
20	transparentes Gitter
21	Linse (mit Feldkorrektur)
22	Detektions-Pinhole
23	Piezoelement
24	Multibanddetektor (Spektrometer)
25	(variables) Spaltfilter
26	Spalt (von 25)

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

Patentansprüche

1. Optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, mit mindestens einem spektral selektiven Element (4) zum Einkoppeln des Anregungslichts (3) mindestens einer Lichtquelle (2) in das Mikroskop und zum Ausblenden des am Objekt (10) gestreuten und reflektierten Anregungslichts (3) bzw. der Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang (12) vom Objekt (10) kommenden Licht (13),
dadurch gekennzeichnet, daß durch das spektral selektive Element (4) Anregungslicht (3, 9) unterschiedlicher Wellenlängen ausblendbar ist.

2. Optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, mit mindestens einem spektral selektiven Element (4) zum Einkoppeln des Anregungslichts (3) mindestens einer Lichtquelle (2) in das Mikroskop und zum Ausblenden des am Objekt (10) gestreuten und reflektierten Anregungslichts (3) bzw. der Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang (12) vom Objekt (10) kommenden Licht (13),
dadurch gekennzeichnet, daß das spektral selektive Element (4) auf die auszublendende Anregungswellenlänge einstellbar ist.

3. Optische Anordnung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß es sich bei dem spektral selektiven Element (4) um ein passives Bauteil handelt.

4. Optische Anordnung nach Anspruch 3, **dadurch g kennz ichnet,** daß das spektral selektive Element (4) als transparentes optisches Gitter (20) ausgeführt ist.

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

5. Optische Anordnung nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet,** daß das spektral selektive Element (4) als holographisches Element ausgeführt ist.

6. Optische Anordnung nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet,** daß das spekral selektive Element (4) als passives AOD (Acousto-Optical-Deflector) (19) oder passives AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) (17) ausgeführt ist.

7. Optische Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet,** daß es sich bei dem spektral selektiven Element (4) um ein aktives Bauteil handelt.

8. Optische Anordnung nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet,** daß das spektral selektive Element (4) akustooptisch und/oder elektrooptisch arbeitet.

9. Optische Anordnung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet,** daß das spektral selektive Element (4) als AOD (Acousto-Optical-Deflector) (19) ausgeführt ist.

10. Optische Anordnung nach Anspruch 9, wobei mehrere Lichtquellen mit unterschiedlichen Wellenlängen einkoppelbar sind, **dadurch gekennzeichnet,** daß das AOD (19) mit entsprechenden Frequenzen vorzugsweise simultan beschaltet ist, so daß die verschiedenen Lichtstrahlen nach dem Durchgang des AOD (19) koaxial mit der optischen Achse des Beleuchtungsstrahlengangs (5) sind.

11. Optische Anordnung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet,** daß das spektral selektive Element (4) als AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) (17) ausgeführt ist.

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

12. Optische Anordnung nach Anspruch 11, wobei eine Lichtquelle mit unterschiedlichen Wellenlängen einkoppelbar ist, **dadurch gekennzeichnet,** daß das AOTF (17) mit entsprechenden Frequenzen simultan beschaltbar ist.

13. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 7 bis 12, **dadurch gekennzeichnet,** daß das spektral selektive Element (4) derart konstruiert ist, daß eine spektrale Auffächerung des Detektionslichts (11) zumindest weitgehend vermieden ist.

14. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet,** daß zur leistungsspezifischen Regelung einzelner Wellenlängen dem spektral selektiven Element (4) mindestens ein weiteres aktives bzw. spektral selektives Element nachgeschaltet ist.

15. Optische Anordnung nach Anspruch 14, **dadurch gennzeichnet,** daß es sich bei dem weiteren spektral selektiven Element um ein AOD (19) handelt.

16. Optische Anordnung nach Anspruch 14, **dadurch gennzeichnet,** daß es sich bei dem weiteren spektral selektiven Element um ein AOTF (17) handelt.

17. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 7 bis 16, wobei das spektral selektive Element (4) eine Ansteuereinheit umfaßt, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Einstellung/Kontrolle der Anregungswellenlänge mit der Ansteuereinheit zwangsgekoppelt ist, so daß nurdiese Anregungswellenlänge vorzugsweise koaxial in den Beleuchtungsstrahlengang (5) des Mikroskops einkoppelbar ist und ausschließlich diese Wellenlänge aus dem Detektionsstrahlengang (12) ausblendbar ist.

18. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Ansteuerung der Lichtquelle (2) mit dem spektral selektiven Element (4) manuell oder automatisch erfolgt.

19. Optische Anordnung nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Ansteuerung der Lichtquelle (2) mit dem spektral selektiven Element (4) nach einer frei definierbaren Vorschrift erfolgt.

20. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, **dadurch gekennzeichnet,** daß dem spektral selektiven Element (4) mindestens ein weiteres optisches Element vor- und/oder nachgeschaltet ist.

21. Optische Anordnung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet,** daß ein im Beleuchtungsstrahlengang (5) dem spektral selektiven Element (4) nachgeschaltetes aktives holographisches Element als Strahlscanner dient.

22. Optische Anordnung nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet,** daß das spektral selektive Element (4) und das nachgeschaltete holographische Element zu einem funktionalen Baustein vereint sind.

23. Optische Anordnung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet,** daß es sich bei dem weiteren optischen Element um ein Strahlanpassungsmittel bzw. um ein Mittel zur Kompensation der durch das spektral selektive Element (4) verursachten spektralen Auffächerung handelt.

24. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **dadurch g k nnzeichnet,** daß das Strahlanpassungsmittel als Linse (16) ausgeführt ist.

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

25. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet,** daß das Strahlanpassungsmittel als Prisma ausgeführt ist.

26. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet,** daß das Strahlanpassungsmittel als Blende, vorzugsweise als Lochblende oder Schlitzblende, ausgeführt ist.

27. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet,** daß das Strahlanpassungsmittel als Filter, vorzugsweise als Sperrfilter, ausgeführt ist.

28. Optische Anordnung nach Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet,** daß das Filter unmittelbar vor dem Detektor (15) angeordnet ist.

29. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet,** daß das Strahlanpassungsmittel als Fokussiermittel ausgeführt ist.

30. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 20 bis 29, **dadurch gekennzeichnet,** daß als weiteres optisches Element ein Farbstrahlteiler zur weiteren spektralen Zerlegung vorgesehen ist.

31. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 20 bis 30, **dadurch gekennzeichnet,** daß als weiteres optisches Element mindestens ein AOTF (17) vorgesehen ist.

32. Optische Anordnung nach Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet,** daß das AOTF (17) als passives Element verwendbar ist.

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

33. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 20 bis 32, **dadurch gekennzeichnet,** daß Kombinationen weiterer optischer Elemente vorgesehen sind.

34. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 33, **dadurch gekennzeichnet,** daß im Detektionsstrahlengang (12) Mittel zur Mehrfachreflexion angeordnet sind, die eine Winkelvergrößerung der Auffächerung des Detektionsstrahls herbeiführen.

35. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 34, **dadurch gekennzeichnet,** daß im Detektionsstrahlengang (12), vorzugsweise unmittelbar vor dem Detektor (15), ein Spaltfilter (25) angeordnet ist.

36. Optische Anordnung nach Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet,** daß das Spaltfilter (25) im Detektionsstrahlengang (12) positionierbar ist.

37. Optische Anordnung nach Anspruch 35 oder 36, **dadurch gekennzeichnet,** daß der Spalt (26) des Spaltfilters (25) variabel ist.

38. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 37, **dadurch gekennzeichnet,** daß im Detektionsstrahlengang (12) nach dem spektral selektiven Element (4) ein Spektrometer zur Detektion der spektralen Auffächerung angeordnet ist.

39. Optische Anordnung nach Anspruch 37, **dadurch gekennzeichnet,** daß der Spektrometer als Multibanddetektor (24) ausgeführt ist.

40. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 39, **dadurch gekennzeichnet,** daß die ausgeblendeten Anregungswellenlängen in Richtung der Lichtquellen (2) aus dem Detektionsstrahlengang (12) abgelenkt werden.

41. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Lichtquelle (2) als Weißlichtquelle ausgeführt ist.

42. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Lichtquelle (2) als optisch parametrisierter Oszillator (OPO) ausgeführt ist.

43. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Lichtquelle (2) als Elektronenstrahlkollisionslichtquelle ausgeführt ist.

44. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Lichtquelle (2) als Laserlichtquelle ausgeführt ist.

45. Optische Anordnung nach Anspruch 44, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Laserlichtquelle in der Wellenlänge variabel durchstimmbar ist.

46. Optische Anordnung nach Anspruch 44 oder 45, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Laserlichtquelle einen Laser mit verschiedenen Wellenlängen umfaßt.

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

47. Optische Anordnung nach Anspruch 44, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Lichtquelle mehrere Laser (2) mit unterschiedlichen Wellenlängen umfaßt.

48. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 44 bis 47, **dadurch gekennzeichnet,** daß der Laser (2) als Farbstofflaser ausgeführt ist.

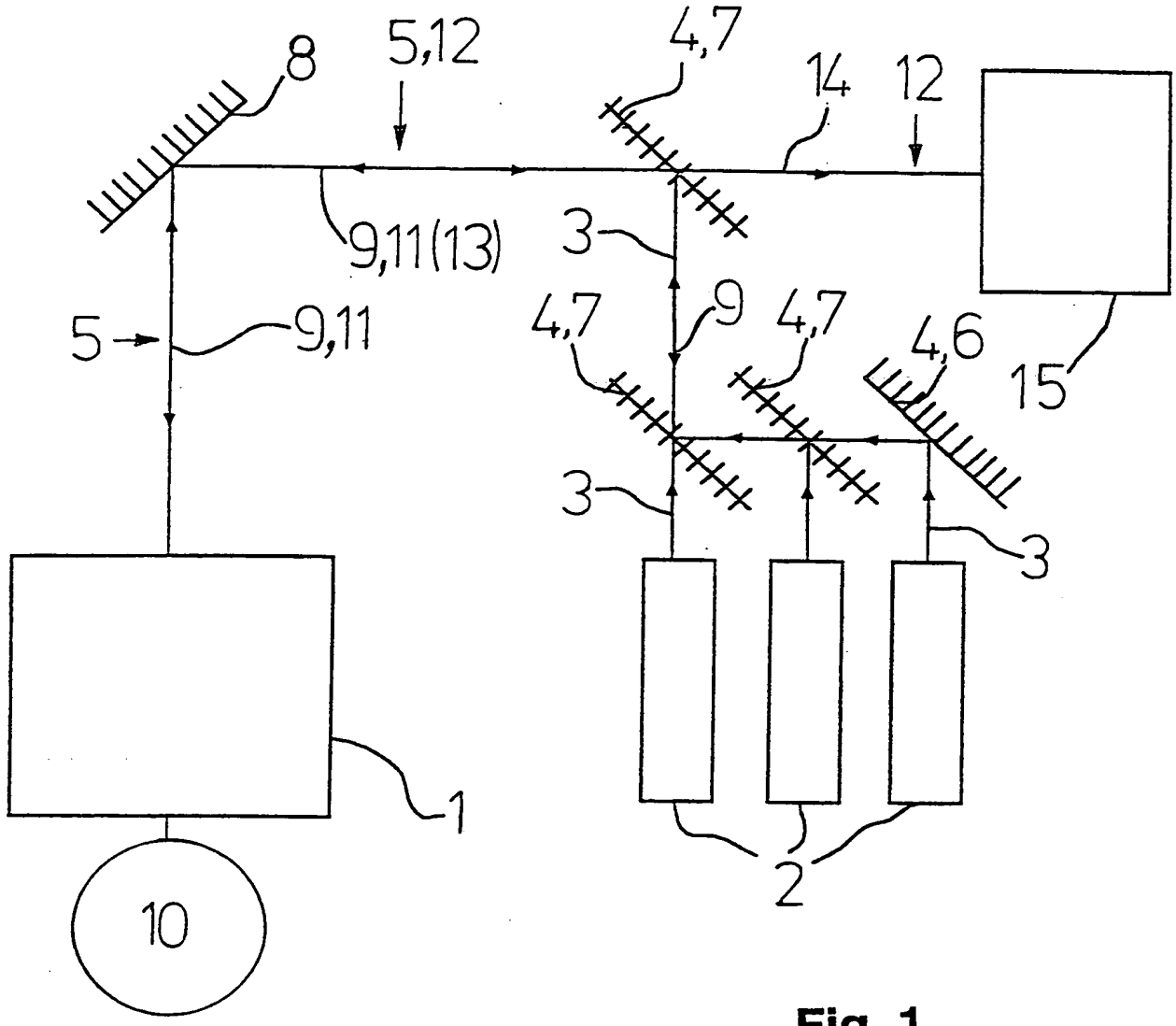


Fig. 1

Stand der Technik

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

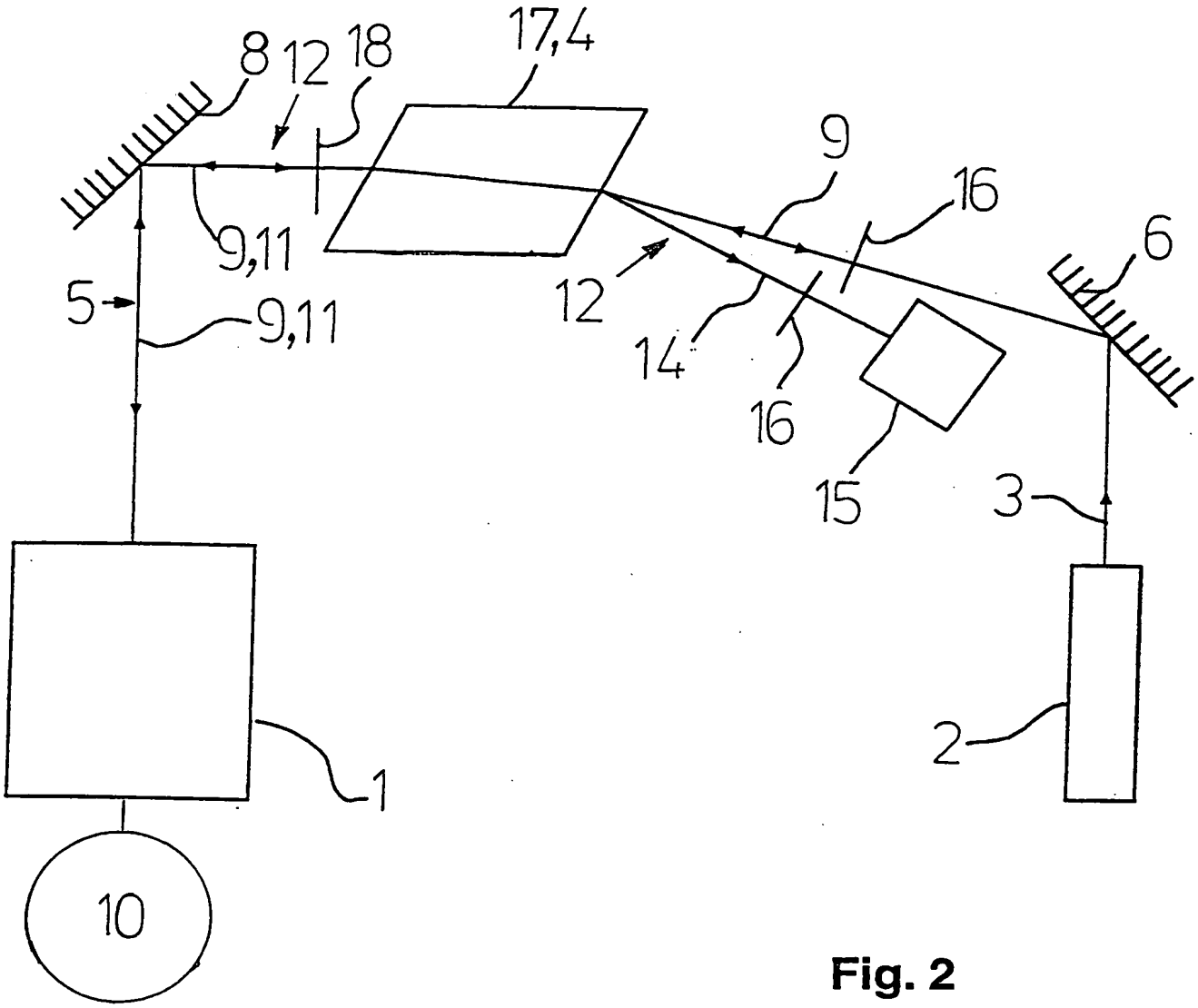


Fig. 2

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

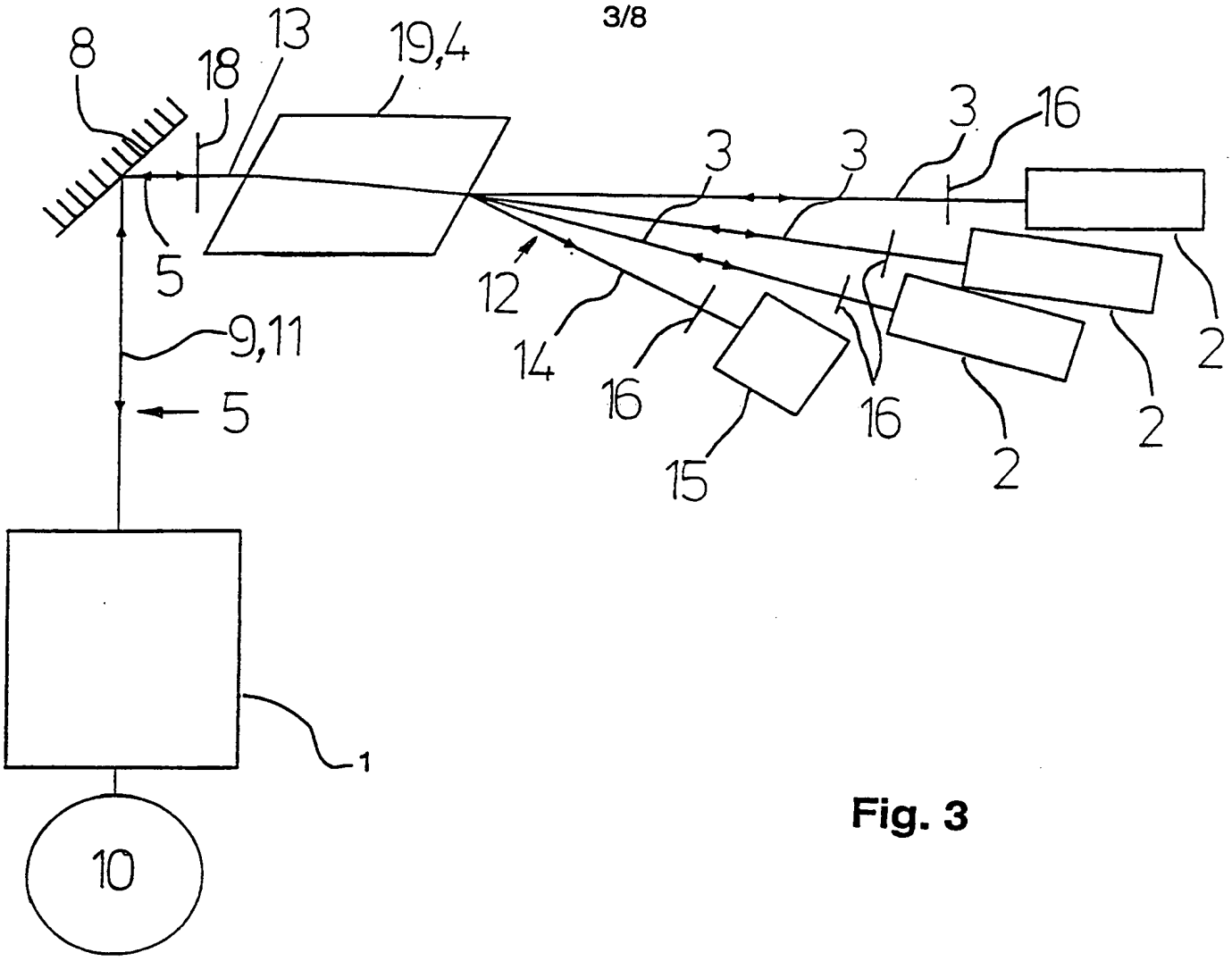


Fig. 3

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

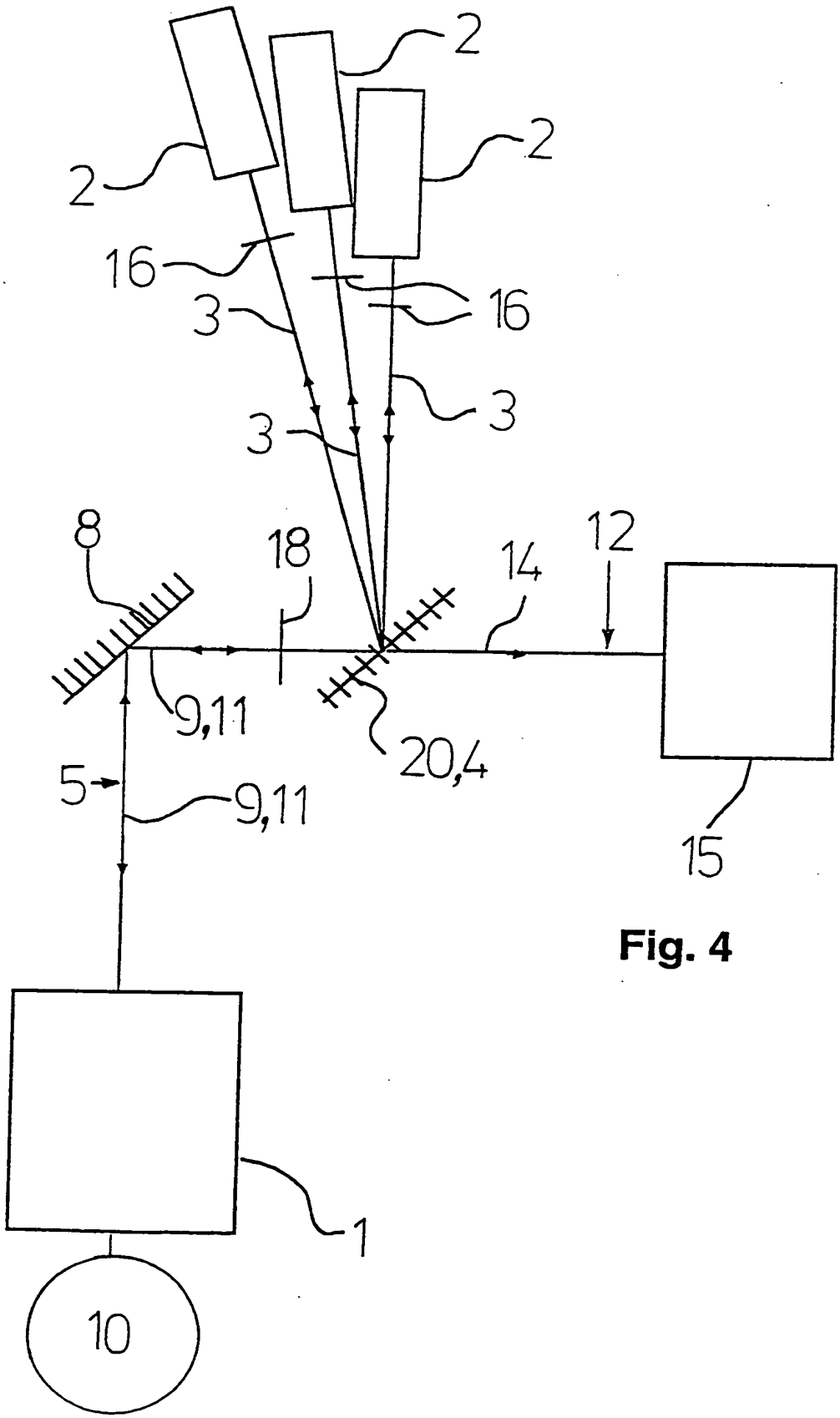


Fig. 4

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

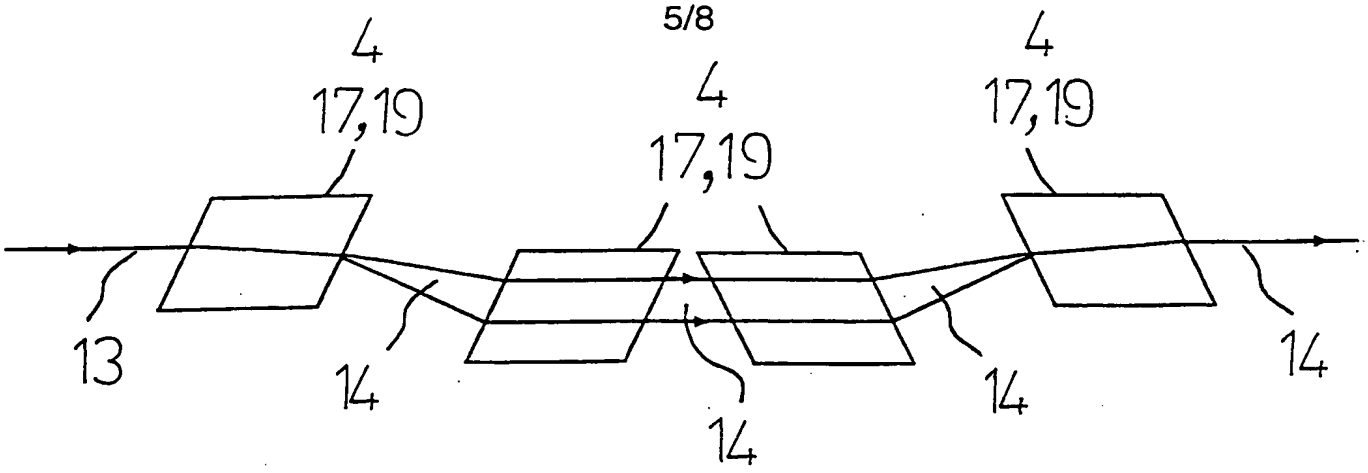


Fig. 5

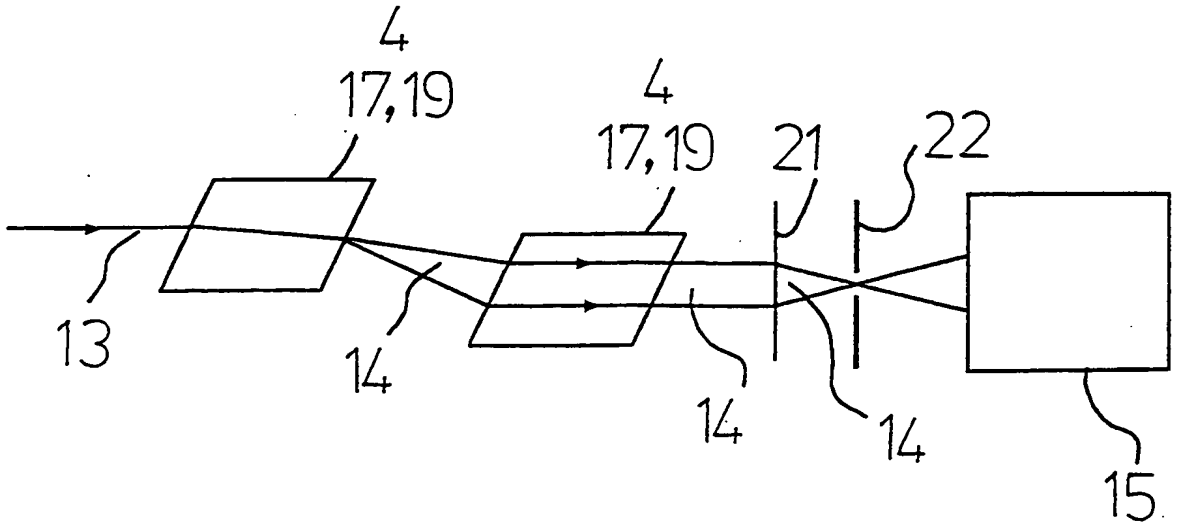


Fig. 6

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

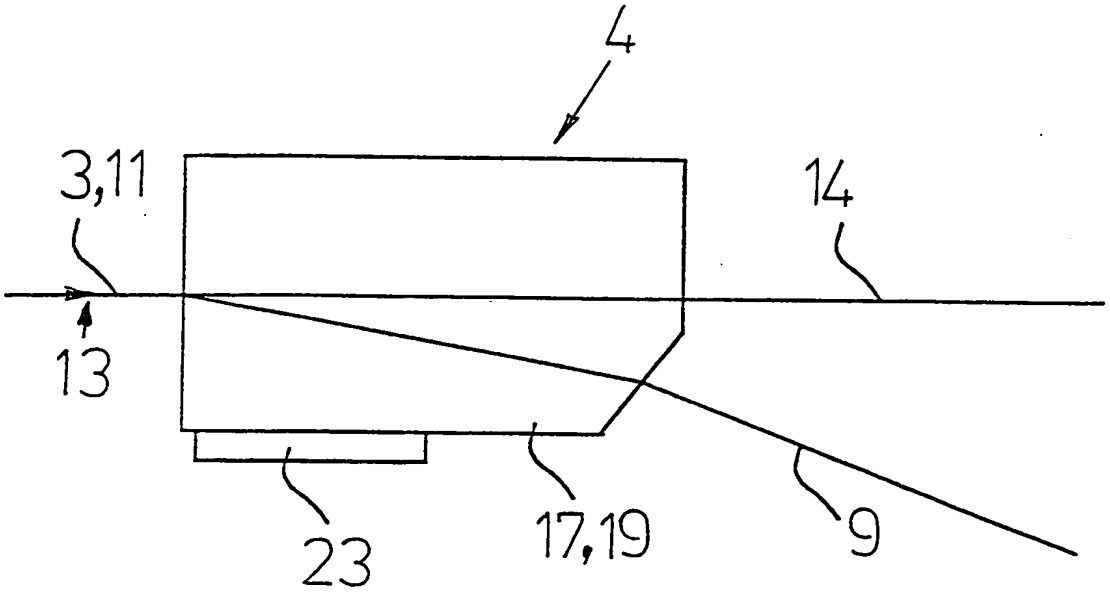


Fig. 7

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

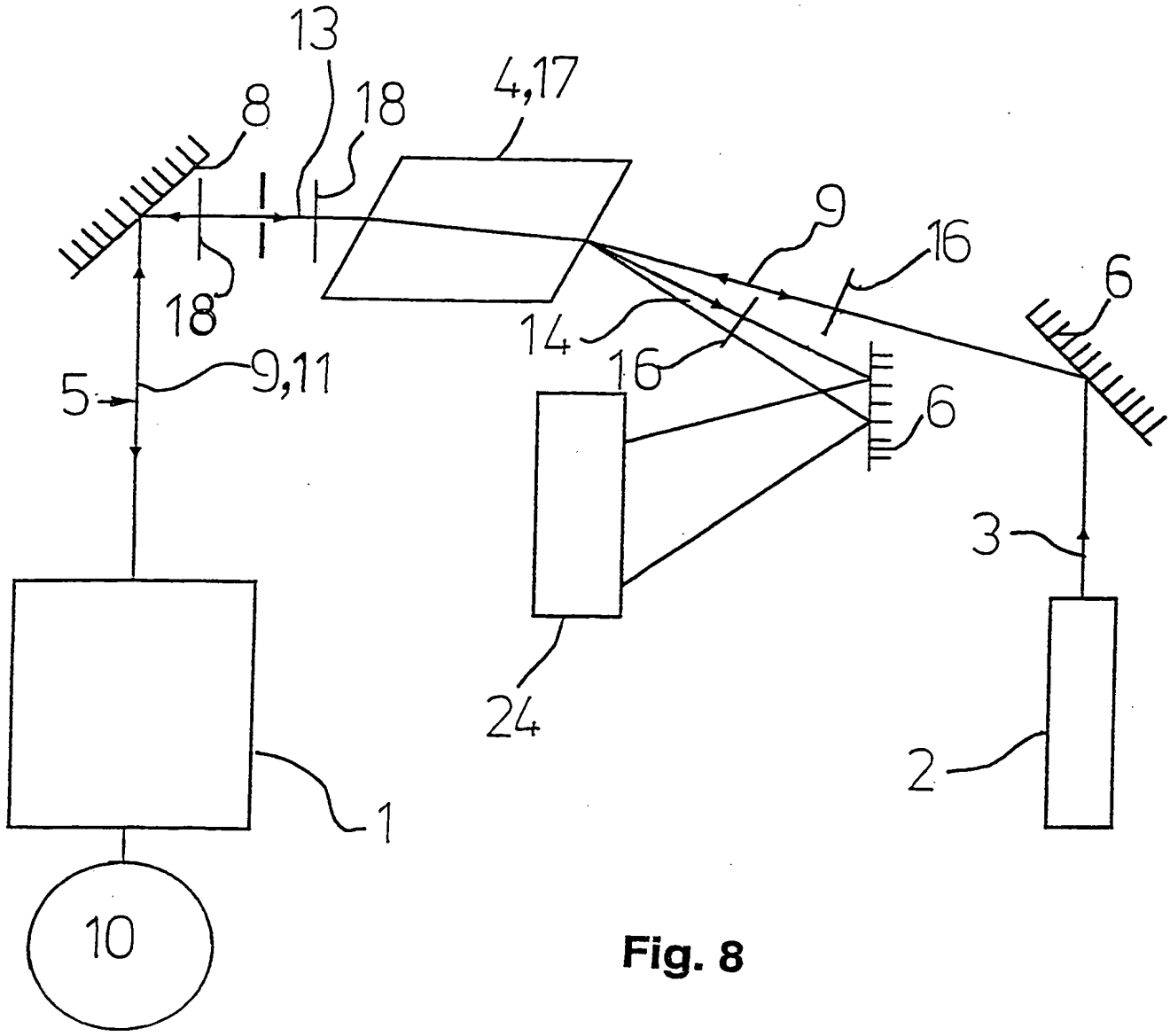


Fig. 8

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

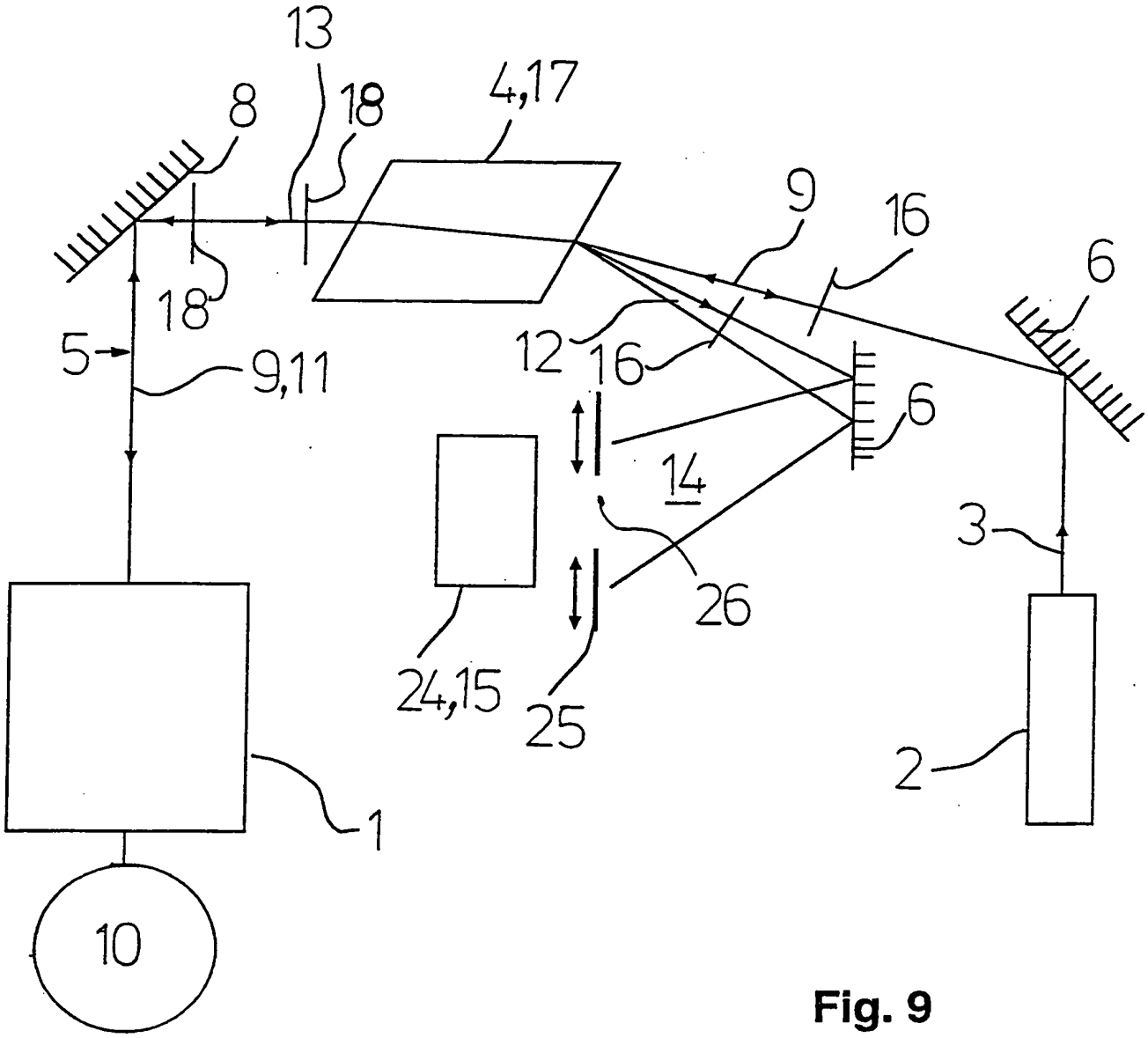


Fig. 9

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 99/00459

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G02B21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G02B G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 196 27 568 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 15 January 1998 (1998-01-15) cited in the application column 3, line 8 - line 23 column 7, line 24 - line 32; claims 1,13,20-22,24,26; figures 2C,E ---	1-3, 18-21, 29,33, 41,44,46
X	US 5 418 371 A (ASLUND NILS R D ET AL) 23 May 1995 (1995-05-23) column 5, line 9 - line 62; figure 1 --- -/--	1,3,14, 18-20, 23,27, 28,30,44

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 July 1999	26/07/1999

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hylla, W

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 99/00459

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 18850 A (MAYO FOUNDATION) 29 October 1992 (1992-10-29) page 5, line 30 - line 34 page 7, line 1 - line 28; figure 2	1,3,14, 20,23, 30,33, 40,44,47
A	WO 92 01966 A (MEDICAL RES COUNCIL) 6 February 1992 (1992-02-06) page 5, paragraph 6 - page 7, paragraph 1; figures 1,2	1-3,14, 20,23, 27,28, 30,33, 40,44,47
A	EP 0 732 582 A (BIO RAD LABORATORIES) 18 September 1996 (1996-09-18) abstract; figures 11,20 column 6, line 19 - line 31 column 6, line 56 - column 7, line 9 column 7, line 47 - column 8, line 19 column 8, line 48 - line 54	1-3, 17-20, 34,38, 44,45
A	WO 88 08550 A (GOLDSTEIN SETH R) 3 November 1988 (1988-11-03) abstract; figure 1	6,9
A	& US 4 827 125 A (GOLDSTEIN SETH R) 2 May 1989 (1989-05-02) cited in the application	
A	US 5 672 880 A (KAIN ROBERT C) 30 September 1997 (1997-09-30) abstract; figure 2 column 4, line 7 - line 21 column 5, line 40 - line 44 column 6, line 36 - line 43	4-9,11

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE 99/00459

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19627568	A	15-01-1998	NONE		
US 5418371	A	23-05-1995	US	5294799 A	15-03-1994
			AT	152519 T	15-05-1997
			DE	69402958 D	05-06-1997
			DE	69402958 T	11-12-1997
			EP	0681695 A	15-11-1995
			WO	9418547 A	18-08-1994
			JP	8506419 T	09-07-1996
WO 9218850	A	29-10-1992	CA	2106296 A	11-10-1992
			EP	0579724 A	26-01-1994
			JP	6506538 T	21-07-1994
			US	5260578 A	09-11-1993
WO 9201966	A	06-02-1992	AT	131942 T	15-01-1996
			DE	69115701 D	01-02-1996
			DE	69115701 T	20-06-1996
			EP	0539471 A	05-05-1993
			JP	5509417 T	22-12-1993
			US	5304810 A	19-04-1994
EP 0732582	A	18-09-1996	US	5591981 A	07-01-1997
			US	5863504 A	26-01-1999
			CA	2171588 A	17-09-1996
			JP	9015171 A	17-01-1999
			US	5784152 A	21-07-1998
			US	5885531 A	23-03-1999
WO 8808550	A	03-11-1988	US	4827125 A	02-05-1989
			AU	1704788 A	02-12-1988
			EP	0362228 A	11-04-1990
			JP	2503959 T	15-11-1990
US 5672880	A	30-09-1997	AU	3963595 A	26-06-1996
			EP	0746865 A	11-12-1996
			JP	9509506 T	22-09-1997
			WO	9618205 A	13-06-1996
			US	5719391 A	17-02-1998

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00459

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G02B21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G02B G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 196 27 568 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 15. Januar 1998 (1998-01-15) in der Anmeldung erwähnt Spalte 3, Zeile 8 - Zeile 23 Spalte 7, Zeile 24 - Zeile 32; Ansprüche 1,13,20-22,24,26; Abbildungen 2C,E	1-3, 18-21, 29,33, 41,44,46
X	US 5 418 371 A (ASLUND NILS R D ET AL) 23. Mai 1995 (1995-05-23) Spalte 5, Zeile 9 - Zeile 62; Abbildung 1	1,3,14, 18-20, 23,27, 28,30,44

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
16. Juli 1999	26/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hylla, W

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00459

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 18850 A (MAYO FOUNDATION) 29. Oktober 1992 (1992-10-29) Seite 5, Zeile 30 - Zeile 34 Seite 7, Zeile 1 - Zeile 28; Abbildung 2	1,3,14, 20,23, 30,33, 40,44,47
A	WO 92 01966 A (MEDICAL RES COUNCIL) 6. Februar 1992 (1992-02-06) Seite 5, Absatz 6 - Seite 7, Absatz 1; Abbildungen 1,2	1-3,14, 20,23, 27,28, 30,33, 40,44,47
A	EP 0 732 582 A (BIO RAD LABORATORIES) 18. September 1996 (1996-09-18) Zusammenfassung; Abbildungen 11,20 Spalte 6, Zeile 19 - Zeile 31 Spalte 6, Zeile 56 - Spalte 7, Zeile 9 Spalte 7, Zeile 47 - Spalte 8, Zeile 19 Spalte 8, Zeile 48 - Zeile 54	1-3, 17-20, 34,38, 44,45
A	WO 88 08550 A (GOLDSTEIN SETH R) 3. November 1988 (1988-11-03) Zusammenfassung; Abbildung 1	6,9
A	& US 4 827 125 A (GOLDSTEIN SETH R) 2. Mai 1989 (1989-05-02) in der Anmeldung erwähnt	
A	US 5 672 880 A (KAIN ROBERT C) 30. September 1997 (1997-09-30) Zusammenfassung; Abbildung 2 Spalte 4, Zeile 7 - Zeile 21 Spalte 5, Zeile 40 - Zeile 44 Spalte 6, Zeile 36 - Zeile 43	4-9,11

1

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00459

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19627568	A	15-01-1998	KEINE		
US 5418371	A	23-05-1995	US	5294799 A	15-03-1994
			AT	152519 T	15-05-1997
			DE	69402958 D	05-06-1997
			DE	69402958 T	11-12-1997
			EP	0681695 A	15-11-1995
			WO	9418547 A	18-08-1994
			JP	8506419 T	09-07-1996
WO 9218850	A	29-10-1992	CA	2106296 A	11-10-1992
			EP	0579724 A	26-01-1994
			JP	6506538 T	21-07-1994
			US	5260578 A	09-11-1993
WO 9201966	A	06-02-1992	AT	131942 T	15-01-1996
			DE	69115701 D	01-02-1996
			DE	69115701 T	20-06-1996
			EP	0539471 A	05-05-1993
			JP	5509417 T	22-12-1993
			US	5304810 A	19-04-1994
EP 0732582	A	18-09-1996	US	5591981 A	07-01-1997
			US	5863504 A	26-01-1999
			CA	2171588 A	17-09-1996
			JP	9015171 A	17-01-1999
			US	5784152 A	21-07-1998
			US	5885531 A	23-03-1999
WO 8808550	A	03-11-1988	US	4827125 A	02-05-1989
			AU	1704788 A	02-12-1988
			EP	0362228 A	11-04-1990
			JP	2503959 T	15-11-1990
US 5672880	A	30-09-1997	AU	3963595 A	26-06-1996
			EP	0746865 A	11-12-1996
			JP	9509506 T	22-09-1997
			WO	9618205 A	13-06-1996
			US	5719391 A	17-02-1998

BNSDOCID: <WO___9942884A1_I_>

PCT WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6 : G02B 21/06, 21/00

A1

(11) International Publication Number: **WO 97/30371**

(43) International Publication Date: 21 August 1997 (21.08.97)

(21) International Application Number: PCT/US97/02479

(22) International Filing Date: 14 February 1997 (14.02.97)

(30) Priority Data:
08/603,030 16 February 1996 (16.02.96) US

(71) Applicant: CARNEGIE MELLON UNIVERSITY [US/US]; 5000 Forbes Avenue, Pittsburgh, PA 15213 (US).

(72) Inventors: WACHMAN, Elliot; 5660 Phillips Avenue, Pittsburgh, PA 15217 (US). FARKAS, Daniel, L.; 434 South Dallas Avenue, Pittsburgh, PA 15208 (US). NIU, Wen-Hua; 5562 Hobart Street, Pittsburgh, PA 15217 (US).

(74) Agents: PENCOSKE, Edward, L. et al.; Kirkpatrick & Lockhart L.L.P., 1500 Oliver Building, Pittsburgh, PA 15222 (US).

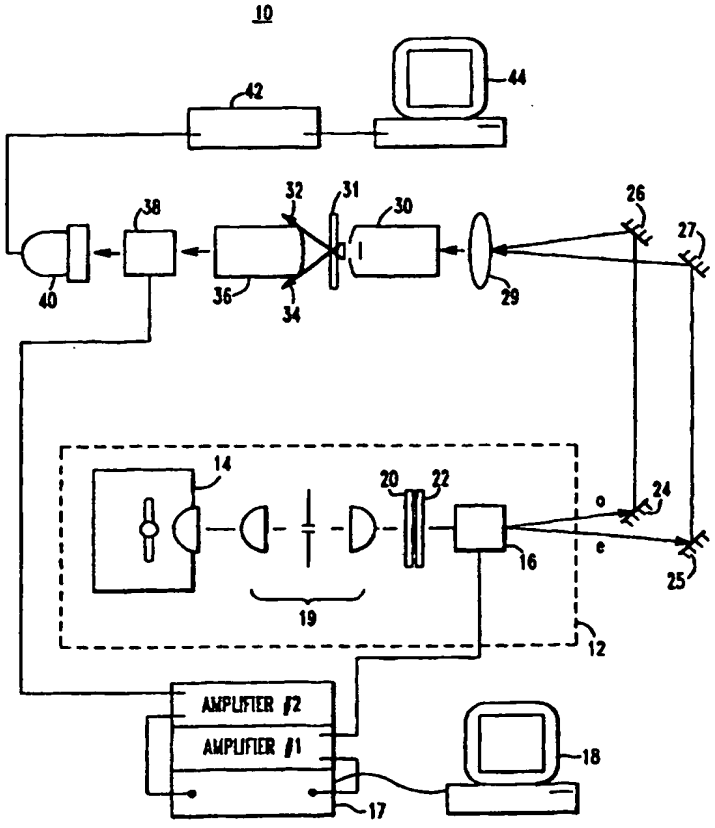
(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published
With international search report.
Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.

(54) Title: LIGHT MICROSCOPE HAVING ACOUSTO-OPTIC TUNABLE FILTERS

(57) Abstract

A light microscope comprises a light source (14) and a first acousto-optic tunable filter (16) responsive to the light source for producing two light streams of different polarization. A control circuit (17) is provided for tuning the first filter to a plurality of frequencies. A mechanism, such as steering optics (24, 25, 26, 27), is provided for combining the two light streams into a combined light stream. Input optics (29) focus the combined light stream. A condenser (30), such as a darkfield condenser, receives the focused, combined, light stream and projects it onto a sample held in a sample plane (31). A second acousto-optic tunable filter (38) is responsive to light from the sample. A second control circuit (17) is provided for tuning the second acousto-optic filter (38) to a plurality of frequencies. The light from the second acousto-optic tunable filter (38) may be captured and stored for future processing.



BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	**GB**	United Kingdom	**MW**	Malawi
AT	Austria	**GE**	Georgia	**MX**	Mexico
AU	Australia	**GN**	Guinea	**NE**	Niger
BB	Barbados	**GR**	Greece	**NL**	Netherlands
BE	Belgium	**HU**	Hungary	**NO**	Norway
BF	Burkina Faso	**IE**	Ireland	**NZ**	New Zealand
BG	Bulgaria	**IT**	Italy	**PL**	Poland
BJ	Benin	**JP**	Japan	**PT**	Portugal
BR	Brazil	**KE**	Kenya	**RO**	Romania
BY	Belarus	**KG**	Kyrgystan	**RU**	Russian Federation
CA	Canada	**KP**	Democratic People's Republic of Korea	**SD**	Sudan
CF	Central African Republic			**SE**	Sweden
CG	Congo	**KR**	Republic of Korea	**SG**	Singapore
CH	Switzerland	**KZ**	Kazakhstan	**SI**	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	**LI**	Liechtenstein	**SK**	Slovakia
CM	Cameroon	**LK**	Sri Lanka	**SN**	Senegal
CN	China	**LR**	Liberia	**SZ**	Swaziland
CS	Czechoslovakia	**LT**	Lithuania	**TD**	Chad
CZ	Czech Republic	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
DE	Germany	**LV**	Latvia	**TJ**	Tajikistan
DK	Denmark	**MC**	Monaco	**TT**	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	**MD**	Republic of Moldova	**UA**	Ukraine
ES	Spain	**MG**	Madagascar	**UG**	Uganda
FI	Finland	**ML**	Mali	**US**	United States of America
FR	France	**MN**	Mongolia	**UZ**	Uzbekistan
GA	Gabon	**MR**	Mauritania	**VN**	Viet Nam

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

LIGHT MICROSCOPE HAVING ACOUSTO-OPTIC TUNABLE FILTERS

BACKGROUND OF THE INVENTION

Cross Reference to Related Application

This application is related to a U.S. patent application entitled Submicron Imaging System Having An Acousto-Optic Tunable Filter filed the same day as the instant application by the same inventors.

Field of the Invention

The present invention is directed to optical microscopes and, more particularly, to the filters used with optical microscopes.

Description of the Background

The light or optical microscope has been a standard tool of the cell biologist for three hundred years. Since the middle of this century, however, other tools and techniques have challenged the optical microscope's position as the preeminent tool of the biologist. Biochemistry has developed techniques to chemically dissect specimens so that how a cell is assembled and how a cell reacts can be deduced by responses to certain chemicals. Genetic techniques have been added to the chemical techniques to enable researchers to infer how cells are assembled and operate. The electron microscope, with its higher

resolving power, has revealed detail not producible with light microscopes.

Those new techniques and instruments, however, have their own drawbacks and limitations. Methods of chemically analyzing or genetically analyzing a sample do not result in images which can be examined, thereby leaving the researcher to infer how the cell came to be in a second state from a first state. The electron microscope requires that the specimen be dried and placed in a high vacuum. For that reason, the electron microscope is used to examine primarily dead specimens such that the researcher is again left to guess at the mechanisms which enable a cell to change from one state to another.

Two advances in technology have lead to a resurgence in light microscopy. The first advance relates to the proliferation of computers as well as the technology for digitizing images. It has long been the practice of researchers to connect cameras to microscopes to produce images which can be studied later. With the availability of low-cost hardware for digitizing images as well as low-cost computers, it is now possible to connect a computer to a microscope and produce digitized images which can be stored for later examination. In addition to storing digitized images, the computer may be used to enhance the images or to

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

automatically search for similarities and differences among a series of images.

The second advance lies in the area of multi-color fluorescent dyes. Fluorescent dyes are designed to attach themselves to specific molecular structures. The dye then, by various mechanisms intrinsic or induced, causes that cell structure to fluoresce. By capturing that fluorescent light, an image of the cell structure of interest can be created. Thus, not only the cell structure, but its location within the cell can be identified. More importantly, dyes can be constructed which cause the particular structure to which they are attached to fluoresce in response to a specific physiological change. Such dyes thus give information of what types of changes are occurring within a cell, where they are occurring, and when they occur. The use of such fluorescent dyes with light microscopes is referred to as fluorescence microscopy.

Because of the ability to cause cells or cell structures to fluoresce in response to biological changes, fluorescence microscopy has been challenged to provide a dynamic instrument capable of sampling multiple spectral parameters. In current, high-speed, multi-spectral applications, discrete filters are incorporated into filter wheels. Because excitation and detection occurs at two distinct wavelengths, a

filter wheel is provided in the excitation system and another filter wheel is provided in the imaging system. As the filter wheels are rotated, different filters are placed into the light stream thereby allowing analysis at different spectral parameters.

Mechanical filter wheels have several drawbacks. First, a filter wheel of any given size can carry only a limited number of discrete filters thereby limiting the number of spectral parameters that can be investigated. Radiation can be discriminated only when the filters are at rest, thereby limiting the timing resolution of the instrument. Finally, precise registration between images of a sample taken at different wavelengths is required to create a multicolor composite image. That is not possible with a mechanical filter wheel, and image post-processing is usually necessary to achieve such results.

To overcome the drawbacks of mechanical filter wheels, acousto-optic tunable filters (AOTF) have been investigated. At least as early as 1987, AOTFs had been proposed for use in connection with fluorescence spectroscopy as a replacement for mechanical wheels. See Kurtz et al., "Rapid Scanning Fluorescence Spectroscopy Using An Acousto-Optic Tunable Filter", Rev. Sci. Instrum. 58 (11), Nov. 1987, p. 1996-2003. AOTFs have also been proposed for use in illumination systems, Spring, "Illumination And Detection Systems

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

For Quantitative Fluorescence Microscopy", Royal Microscopical Society, 1987, p. 265-279, and in imaging systems, Morris et al., "Imaging Spectrometers For Fluorescence And Raman Microscopy: Acousto-Optic And Liquid Crystal Tunable Filters", Applied Spectroscopy, Vol. 48, No. 7, 1994, p. 857-866. The latter article by Morris et al. contains a side-by-side comparison of AOTF and liquid crystal tunable filter technologies as applied to fluorescence microscopy.

While such technologies eliminate the mechanical parts associated with filter wheels, and also eliminate timing and registration problems, such tunable filters typically are inferior to mechanical filters with respect to eliminating out-of-band illumination, overall throughput and, for imaging systems, image clarity. For example, the elimination of out-of-band frequencies in conventional mechanical filters is on the order of 10^{-5}, whereas the elimination of out-of-band frequencies for AOTFs is on the order of 10^{-2} or 10^{-3}. Additionally, with mechanical filters, spatial resolution of under 0.3 microns is typical whereas the best spatial resolution previously reported using AOTF's is 8-10 microns. For those reasons, mechanical filters are still commonly used. Thus, the need exists for a system which provides the benefits of no moving parts, with maximum spectral versatility and minimal timing and registration problems, while at the same

time optimizing throughput, reducing background, and providing the same image sharpness as obtained by using conventional fluorescence microscopes equipped with mechanical filter wheels.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to a light microscope having a light source and an acousto-optic tunable filter responsive to the light source for producing two light streams of different polarization. A control circuit is provided for tuning the acousto-optic filter. In one embodiment, steering optics are used to combine the two light streams into a combined light stream. Input optics focus the combined light stream onto a sample, in one embodiment, preferably through a dark-field condenser. Imaging optics are responsive to light from the sample for producing an image therefrom. The image may be filtered and saved for later processing. According to one embodiment of the invention, the image may be filtered through a second AOTF, captured by a CCD camera, and saved for later processing.

As mentioned, two of the primary difficulties with using acousto-optic tunable filters on light microscopes are the limited amount of light which can be passed through the filter and the leakage light, i.e., the amount of out-of-bandwidth light. According to one embodiment of the present invention, those

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

obstacles can be greatly reduced by combining th two light streams of different polarization produced by the acousto-optic tunable filter and using a dark-field condenser. In addition, the light microscope disclosed and claimed herein produces images having substantially the same degree of spatial resolution as those produced by microscopes using mechanical filters.

The light microscope of the present invention enjoys all of the benefits which flow from the use of acousto-optic tunable filters. Hence, for example, the light microscope of the present invention can switch quickly between light of different frequencies to investigate transitions as they occur. In addition, the excitation and imaging filters may be swiftly turned on and off one after the other to measure time-delayed luminescence from cell structures labelled with luminescent probes.

Finally, spectral versatility is greatly increased. In particular, dyes which are designed to fluoresce at given frequencies may have their peak fluorescence above or below the expected frequency due to interaction with the sample or the medium. Additionally, the frequency at which peak fluorescence occurs may change from sample to sample or media to media. The AOTFs allow the excitation and imaging spectra to be empirically tuned to match such changes thereby enabling the amount of light collected from the

sample to be optimized, enhancing image quality. Those advantages and benefits of the present invention, as well as others, will become apparent from the Description of the Preferred Embodiments hereinbelow.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

For the present invention to be clearly understood and readily practiced, the present invention will be described in conjunction with the following figures wherein:

FIG. 1 illustrates a light microscope constructed according to the teachings of the present invention;

FIG. 2 illustrates phase-matching in a noncolinear AOTF;

FIG. 3 illustrates the light path in an ideal AOTF imaging system;

FIG. 4 is a schematic of a light microscope incorporating an imaging system constructed according to the teachings of the present invention which was used to conduct tests;

FIG. 5 is an experimental setup to perform wavelength measurements outside the microscope of FIG. 4;

FIGs. 6a through 6c illustrate three photographs of dark-field images of 0.121 micron opaque beads taken at a frequency of 74 MHz using one (FIG. 6a), two (FIG. 6b), and six (FIG. 6c) transducer slices corresponding

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

to transducer lengths of 0.33 micron, 0.66 micron, and 1.98 micron, respectively;

FIGs. 7a through 7c are graphs illustrating intensity versus wavelength data (FIG. 7a), intensity versus angle data (FIG. 7c), and theoretical results (FIG. 7b) for the three different images of FIGs. 6a - 6c;

FIGs 8a and 8b illustrate the effect of image deconvolution on image quality using the standard Air Force resolution target and a transducer length of 1.98 micron shown before (FIG. 8a) and after (FIG. 8b) the convolution;

FIGs. 9a, 10a, and 11a are ultra high resolution AOTF images of actin fibers in fluorescence;

FIGs. 9b, 10b, and 11b are graphs representing line intensity profiles taken along the light lines shown at the bottom right in each of the respective "a" figures;

FIGs. 12a - 12c illustrate electronic control of AOTF filter bandwidth;

FIG. 13 is an illustration of the electronic control of AOTF filter bandwidth;

FIGs. 14a and 14b define the AOTF parameters;

FIG. 15 illustrates an alternative embodiment for the excitation portion of the system illustrated in FIG. 1;

FIG. 16 illustrates a portion of a light microscope constructed according to the teachings of the present invention wherein the light source is a multiline laser; and

FIGs. 17, 18, and 19 illustrate alternative embodiments for the imaging portion of the system illustrated in FIG. 1.

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

FIG. 1 illustrates a light microscope 10 constructed according to the teachings of the present invention. The light microscope 10 has an excitation portion 12 which includes an excitation source 14. Because of the losses inherent in acousto-optic tunable filters and optics traditionally used in microscopes, it is necessary to provide a powerful, point light source so as to provide sufficient illumination to illuminate the sample. In one embodiment, a light source 14 which is a 500 watt xenon arc lamp having a short arc, e.g. an arc length of less than one millimeter, is used. A multiline laser source may also be used.

The excitation portion 12 includes an acousto-optic tunable filter (AOTF) 16. The AOTF 16 is tuned by an arbitrary wave-form generator 17 through the first of two independent output amplifiers. An AOTF control work station 18 may be provided for controlling

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

the wave-form generator 17 and for viewing the signals applied to the AOTF 16. It is desirable under certain circumstances, as will be discussed in greater detail hereinbelow, to multiplex the signals which are applied to tune AOTF 16. By multiplexing signals, the band of frequencies passed by the filter 16 can be increased.

It is known that acousto-optic tunable filters can be damaged if appropriate precautions are not taken. Also, it is desirable to process the light so that the rays are essentially parallel to one another. Accordingly, interposed between light source 14 and AOTF 16 are spatial filter 19, infrared filter 20, and ultraviolet filter 22.

The light produced by light source 14, after passing through filters 19, 20, and 22, is input to the AOTF 16. The AOTF 16 produces two streams of light, one o-polarized and one e-polarized. Steering optics, which may take the form of mirrors 24, 25, 26, and 27, steer the two light streams of different polarization so as to combine the two light streams into a combined stream directed to the microscope's input optics 29. It is anticipated that the function provided by the steering optics could also be performed by conductive optic fibers.

The combined light stream, after leaving input optics 29, is input to a dark-field condenser 30. A sample (not shown) is held in a sample plane 31, by

conventional means. The combined light stream output from the dark-field condenser 30, illuminates the sample in a manner such that the excitation radiation, represented by rays 32 and 34, falls outside of the scope of an objective lens 36. In that manner, the excitation illumination is separated from the fluorescence of the sample so that out-of-bandwidth radiation is minimally commingled with fluorescence from the sample.

The objective lens 36 produces an image of the sample which may be filtered by a second acousto-optic tunable filter 38. The AOTF 38 is tuned by the generator 17 through the second of the independent output amplifiers. After the image has been filtered, it may be captured, for example, by a charge coupled device (CCD) 40. The CCD 40 is under the control of a controller 42 which is in communication with an image processing work station 44. The CCD device 40 may capture the image which is stored in the image processing workstation 44. A CCD controller 42 is also provided. After the image has been stored, known software routines for examining the image, or for further processing the image, may be performed.

The excitation AOTF 16 may be implemented by a first crystal while the emission AOTF may be implemented by a second crystal satisfying the

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

following parameters and available from NEOS Technologies:

Crystal #	Aperture	W	H	L	θ_i	θ_a	θ_t	Transducer Length	Frequency Range
16	25mm	30 mm	27 mm	34mm	8°	3.95°	10.95°	15mm	34-81MHz
38	17mm	22mm	22mm	48mm	12°	5.9°	16.35°	27mm	48-107 MHz

The AOTF parameters in the preceding table are defined in FIGs. 14a and 14b. The AOTF's 16 and 38, under the control of workstation 18 as shown in FIG. 1, can provide rapid wavelength switching, rapid shuttering, and control over the intensity of the excitation radiation.

Theoretical Background

The presence of an acoustic wave inside a medium creates a periodic modulation of its index of refraction via the elasto-optic effect. This modulation acts as a three-dimensional sinusoidal phase grating for light incident on the crystal, leading to diffraction of certain wavelengths at an angle from the incident beam direction. In an acousto-optic tunable filter, this diffracted light is used as the filter output, and the grating frequency is electronically controlled by varying the RF frequency applied to a piezoelectric transducer bonded to one of the faces of the crystal. That results in an all-electronic, broadly tunable spectral filter with tuning speeds determined by the acoustic transit time in the crystal (typically under 50 μs).

When driven with multiple closely-spaced RF frequencies, the AOTF also provides electronically variable bandwidth control. As shown in FIGs. 12a - 12c, combinations of frequencies can be used to increase the light throughput of the crystal. FIG. 12 illustrates intensity versus wavelength graphs for one frequency (FIG. 12a, $\Delta\lambda$ = 7.5 nm), three frequencies (FIG. 412b, $\Delta\lambda$ = 23 nm), and five frequencies (FIG. 12c, $\Delta\lambda$ = 37 nm). FIG. 13 demonstrates the broad electronic tuning of the crystal throughout the visible spectrum.

The interaction of acoustic and optical plane waves in an anisotropic medium may be described by a pair of coupled differential equations. Useful solutions to these equations occur when the phase-matching conditions are satisfied:

(1) $$k_d = k_i + k_a$$

where $k_d = 2\pi n_d/\lambda$, $k_i = 2\pi n_i/\lambda$, and $k_a = 2\pi F/V$, with F the acoustic frequency, V the acoustic speed in the crystal, λ the optical wavelength, and $n_{i,d}$ the crystal indices of refraction for the incident and diffracted beams, respectively. For the case of an o-polarized incident wave (this is the preferred polarization for imaging in a TeO_2 AOTF), equation (1) may be written:

(2) $$n_e(\lambda,\theta_d)\cos(\theta_d) - n_o(\lambda)\cos(\theta_i) + F\lambda/V \sin(\alpha) = 0$$

$$n_e(\lambda,\theta_d)\sin(\theta_d) - n_o(\lambda)\sin(\theta_i) - F\lambda/V \cos(\alpha) = 0$$

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

where θ_i and θ_d are the angles between the incident and diffracted beam wave-vectors and the optic axis, n_e and n_o are the extraordinary and ordinary indices of refraction, and α is the angle between the acoustic wave-vector, k_a, and the acoustic axis, as shown in FIG. 2. These equations determine the spectral tuning characteristics of AOTFs.

For AOTF imaging applications, image fidelity must also be considered. The use of an AOTF as an imaging filter for o-polarized white light is illustrated in FIG. 3. A sample 110 to be imaged lies in a sample plane 112. Light fluorescing from the sample 110 is input to input optics 114 which produce O-polarized collimated light represented by light rays 116. The light rays 116 are input to an AOTF 118 which produces e-polarized detracted beams at wavelengths λ. The diffracted beams at wavelength λ are input to output optics 120 which focus an image 122 onto an image plane 124.

In the configuration illustrated in FIG. 3, every point on the sample 110 gives rise to a bundle of multichromatic parallel rays 116 incident on the crystal 118 at a single angle θ_i. Ideally, as shown by the dashed lines in FIG. 3, the diffracted portion of this bundle should exit the crystal 118 as a bundle of monochromatic parallel rays described by a unique θ_d. In that case, each point on the sample plane 112 will map to a single point on the image plane 124. In practice, however, it is found that the diffracted ray bundle consists of rays leaving the crystal 118 over a range of

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

different output angles as indicated by the dashed-dot lines in FIG. 3. As a result, each sample plane point maps to a distribution of image plane points, leading to a blurred image even for fixed frequency operation.

A second image degrading effect, image shift, occurs when the radio frequency, F, is varied. The phase matching equations (2) dictate that changes in F result in changes in both the wavelength, λ, and the diffracted angle, θ_d, for fixed θ_i and α. That leads to a shift in image position for different wavelengths. Appropriate cut of the crystal exit face, however, can eliminate that almost entirely.

Because the transducer (not shown in FIG. 3) attached to the AOTF 118 is of finite length, the acoustic field it produces may be described as a superposition of plane waves at various acoustic angles, α. For white light illumination at a given operating frequency, F, and incident beam direction, θ_i, each such α will produce a diffracted output at a distinct angle θ_d and wavelength λ. The spread in acoustic angle resulting from the finite transducer length consequently gives a diffracted output containing a range of angles and wavelengths, even for fixed incident beam direction, resulting in a filtered image which is blurred. AOTF image blur is, therefore, primarily attributable to acoustic beam divergence in the crystal.

For negligible incident light depletion (an approximation valid for AOTF efficiencies up to about 70%), the relationship between the acoustic angle intensity

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

spectrum and the diffracted output intensity spectra may be derived explicitly for plane waves from the AOTF interaction equations. For fixed F and θ_i we have:

(3) $I_{out}(\lambda,\theta_d)=C^2 x I_{inc}(\lambda) x I_\alpha(\alpha)\ x\ \delta[\kappa_d(\theta_d,\lambda)-\kappa_i(\theta_i,\lambda)-\kappa_a(\alpha,F)]$.

In this equation, I_{out} is the diffracted intensity; C is a constant; I_{inc} is the wavelength spectrum of the incident light; I_α is the acoustic angle intensity spectrum, proportional to the squared magnitude of the Fourier transform of the transducer profile in the direction of light propagation; and the delta function, δ, expresses the phase matching requirement. In the case of white light illumination (I_{inc}= constant), this equation shows that the diffracted intensity is directly proportional to the acoustic angle spectrum:

(4) $I_{out} \sim I_\alpha(\alpha)$.

Because both λ and θ_d are functions of α via the phase-matching equations (2), I_{out} can be expressed either in terms of wavelength or in terms of output angle. When expressed in terms of wavelength, $I^{\lambda}_{out}(\lambda)$, it may be identified as the bandpass profile of the filter; when expressed in terms of angle, $I^{\theta d}_{out}(\theta_d)$, it may be interpreted as the image blur profile. This equation shows that both of these are determined by the Fourier transform of the transducer structure.

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

The importance of the acoustic angle distribution on the spectral bandpass of an AOTF is well-known but has not been thoroughly investigated because for the majority of imaging AOTFs operating with a 10 μm or greater spatial resolution, the effect of the acoustic angle distribution on image quality is insignificant. However, for an image resolution of a few microns or less, as needed in microscopy, this effect becomes highly significant. The following experimental setup was designed to quantify this effect.

Experimental Setup

FIG. 4 is a schematic of a light microscope incorporating an imaging system constructed according to the teachings of the present invention which was used to conduct tests. In FIG. 4, components performing the same function as those identified in conjunction with FIG. 1 carry the same reference numeral. In FIG. 4, the arc lamp 14 produces light which passes through an excitation filter 46 before being input to the dark-field condenser 30. Light from the dark-field condenser 30 is used to illuminate a sample (not shown) held in the sample plane 31. The objective lens 36 is responsive to the light fluoresced by the sample. The light gathered by the objective lens 36 is input to the second AOTF 38 which is under the control of the arbitrary waveform generator 17 and the AOTF work station 18.

The light output from the AOTF 38 passes through steering optics, i.e., mirrors 48, 50, to a tube lens 52 and

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

a two power coupler 54 before being input to the CCD camera 40. The CCD camera 40 is under the control of the CCD controller 42 and the imaging work station 44.

The AOTF crystal used for filter 38 consists of a five centimeter long TeO_2 crystal with an optical aperture of seventeen millimeters, cut for an incident optical angle of twelve degrees and an acoustic angle of 5.95°. The exit face angle is cut at 16.35° to eliminate image shift. The transducer is sectioned into seven slices, each 0.33 cm in width. The transducer has four independent input ports: three ports are connected to two slices each, and one is connected to a single slice. The main outstanding feature of that design is the crystal's unusual length and its impact on device performance as will be described in detail below.

Drive electronics are controlled by a Macintosh IIci computer 18 and include a 400 MHz Arbitrary Waveform Generator 17 (LeCroy model LW420) and a single channel four-output broadband RF amplifier (amplifier #2) with four watt maximum total output (NEOS Technologies). Operation is possible from 50-110 MHz, corresponding to diffracted optical wavelengths between 450 - 800 nm.

The AOTF 38 is installed behind the objective lens 36 in a research-grade fluorescence microscope (Zeiss Axioplan). Sample illumination is performed in transmission using either a seventy-five watt xenon or one hundred watt mercury arc lamp (Zeiss). For the fluorescence measurements, a standard rhodamine excitation interference filter 46 is also used

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

(Omega, 540DF19). Microscope optics include a dark-field condenser 30 (Zeiss part no. 445315; minimum NA = 1.2, maximum NA = 1.4), and 40x and 100x oil-immersed iris objectives 36 (Olympus UApo 340(40x), 0.65<NA<0.35; and UPlanFl(100x), 0.6<NA<1.3). Dark-field optics are used to compensate for the inadequate background rejection of the present AOTF crystal 38.

Images are recorded using a CCD camera 40 with a 1317x1035 array of 6.8 μm square pixels (Princeton Instruments model CCD 1317-K; Kodak KAF1400 CCD array) coupled to the microscope with a two power coupler 54 (Diagnostic Instruments model HRP-200). Images are stored and processed on a Macintosh 7100 computer 44.

Wavelength measurements are performed outside the microscope of FIG. 4 with the apparatus shown in FIG. 5. The seventy-five watt xenon lamp 14 is followed by a spatial filter 56 with a tightly closed iris at its focus which produces nearly parallel rays of white light at the entrance to the AOTF 38. The diffracted beam leaving the AOTF crystal 38 is directed into an optical multichannel analyzer consisting of a 1/4-m monochromator 58 (Photon Technology International) and silicon array detector 60 (EG&G model 1420 with EG&G model 1461 controller 62) under computer 64 control.

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

Experimental Results

The diffracted intensity distribution from an AOTF, Iout(λ,θd), is ultimately determined by the topology of its transducer. To experimentally demonstrate this relationship, we placed opaque 0.121 μm diameter polystyrene beads (Molecular Probes, Inc.) in the sample plane 31 of the set-up shown in FIG. 4. When excited with the seventy-five watt xenon lamp, each bead appears as a quasi-point source of white light through the infinity-corrected optics of the microscope. That gives rise to a bundle of nearly parallel rays at θ_i entering the AOTF 38. For a given operating frequency, therefore, the resulting AOTF output is well described by the diffracted intensity distribution I_{out} of equation (4). Changing the transducer profile by disconnecting one or another of the transducer ports should consequently result in substantially different AOTF bead images.

Dark-field images of the single 0.121 μm diameter bead taken through the AOTF 38 with a 40x objective 36 are shown in FIGs. 6a - 6c for one, two, and six transducer slices, respectively, corresponding to transducer lengths of 0.33 μm, 0.66 μm, and 1.98 μm, respectively. The images were taken with the AOTF 38 operating at a frequency of 74 MHz and an efficiency of approximately 60%. The color scale in FIGS. 6a - 6c is not linear. The center bright spot in each figure represents the primary AOTF image of the bead; the narrower this spot, the better the AOTF resolution. The increase in

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

resolution with longer transducer length expected from equation (4) is clearly evident. The center spot in FIG. 6c, produced by six transducer slices, corresponds to a resolution of 1 μm. The secondary spots on either side of the center arise from the sidelobes in the transducer Fourier transform. These are reduced in intensity relative to the main peak by one to two orders of magnitude. Note the differences in number, placement, and relative intensity of the sideband peaks for each of the various transducer configurations of FIGs. 6a, 6b, and 6c.

FIGs. 7a - 7c quantify the data of FIGs. 6a - 6c and compare it to theory. Fig. 7a displays the dependence of intensity on wavelength for FIGs. 6a - 6c measured using the set-up shown in FIG. 5. FIG. 7c displays the dependence of intensity on AOTF output angle (it is proportional to distance from the central spot) for FIGs. 6a - 6c. These were obtained by taking intensity profiles of images obtained with the CCD 40 of FIG. 4, and are, in effect, measurements of $I_{out}^{\theta d}(\theta d)$. According to equation (4), both sets of data should be proportional to the acoustic angle profiles I_α, for each of the transducer configurations shown.

FIG. 7b shows calculated results, computed by taking the squared magnitude of the Fourier transform of each transducer profile, taking into account the slice separation of approximately 0.5 mm. The theoretical curves for these three configurations have pronounced differences in center peak width and side-band structure reflecting the differences

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

between their Fourier transforms. These features are also strikingly evident in the experimental data shown in FIG. 7a and 7c. Indeed, the detailed correspondence between measured and calculated results is a remarkable confirmation of equation (4). FIGs. 7a - 7c quantitatively demonstrate the effect of transducer structure on the spectral and angular output characteristics of acousto-optic imaging filter 38.

The diffracted intensity distributions shown result in two types of image degradation. The center peak width leads to decreased image resolution, and the sideband structure leads to decreased image contrast. With the quantitative results shown by FIGs. 7a and 7c, however, these effects can now be compensated for using digital image processing techniques. In particular, the curves of FIG. 7c represent intensity profiles of AOTF images of a white light point source. This is, in effect, the measured white light point spread function (psf) for the AOTF in the microscope. Note that this psf is one-dimensional because AOTF blur occurs only along one axis. With this psf, it is straightforward to use computational image processing to deconvolve the effect of the AOTF image blur from the raw images. Expectation-maximization is ideally suited for this task. See, for example, L. A. Shepp and Y. Vardi, "Maximum-likelihood reconstruction for emission tomography," IEEE Trans. Med. Imag. 1, pp 113-121 (1982) and T. Holmes, "Maximum-likelihood image restoration adapted for noncoherent optical imaging," J. Opt. Soc. Am. A 7, pp. 666-673 (1988).

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

The power of this approach may be seen in FIGs. 8a and 8b. A standard Air Force resolution target (Applied Image) is imaged through the AOTF 38 using white light brightfield illumination with six transducer slices connected. The figure displays Group 8 of this target both before (FIG. 8a) and after (FIG. 8b) processing. AOTF blur is clearly evident in the horizontal direction of the raw image of FIG. 8a. Processing removes much of the sideband-related blur, as well as partially compensating for the width of the central peak of the diffracted intensity distribution. This results in a significant contrast increase in the deconvolved image, as well as a pronounced sharpening of the target lines. The finest pattern at the bottom of the figure consists of 1.1 μm lines and spaces. These are resolved without difficulty.

To resolve even smaller structures and determine more precisely the effectiveness of the deconvolution algorithm, actin fibers in 24-hour serum-deprived 3T3 cells fixed with formaldehyde, stained with rhodamine phalloidin, and mounted in gelvatol were examined. Illumination was provided with the 546 nm line of the one hundred watt mercury lamp. In this case, per equation (3), the white light psf used above must now be multiplied by the actual spectrum of light incident on the AOTF, I_{inc}, where:

$$I_{inc}(\lambda) = \eta I_{exc}(\lambda) + I_{fl}(\lambda), \quad (5)$$

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

with I_{exc} the spectrum of the excitation light, I_{fl} the fluorescence spectrum of the stained fibers, and η a constant indicating the relative magnitude of scattered excitation light to fluorescence at the entrance to the AOTF 38.

FIGs. 9a and 10a show images of these actin fibers taken with the 40x objective 36 through the AOTF 38 before and after deconvolution, respectively. FIGs. 9b and 10b are intensity profiles taken along the white lines shown in the bottom right corner of each of FIGs. 9a and 10a, respectively. The minimum feature size resolvable in the raw image of FIG. 9a is approximately 1 μm. With deconvolution, resolution is increased to about 0.8 μm, and image contrast is improved approximately threefold. This increased image resolution and contrast with processing may be clearly seen in the intensity profile graphs of FIG. 9b and 10b.

Higher AOTF resolution may be obtained using a 100x objective as shown in FIG. 11a. Here, the angular separation of the ray bundles emanating from two points in the sample plane is magnified by a factor of 2.5 relative to the 40x objective. As a result, the angular blur introduced by the AOTF, which is independent of objective, becomes proportionally less significant. The raw image (not shown) corresponding to the deconvolved image in FIG. 11a, has nearly the same resolution as the processed image, although with several times less contrast. The image shown in FIG. 11a corresponds to that marked by the white rectangle in the

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

lower corner of FIG. 10a. The intensity profile graph shown in FIG. 11b is taken along the same line as in FIGs. 9a and 10a. Features are resolved in the 100x graph of FIG. 11b which are just barely visible in the 40x graph of FIG. 10b. These correspond to a resolution in the 100x image of approximately 0.35 μm, equal to that of a conventional light microscope using mechanical filter wheels.

Conclusions

The three biggest limitations that have thus far restricted the widespread use of AOTFs for imaging spectroscopy are their relatively poor out-of-band rejection, lower throughput (due in part to their polarization selectivity), and their poor imaging quality. The present invention represents a major step in overcoming such limitations. With the superior speed and spectral versatility of the AOTF, the present invention opens up many new and exciting application for AOTFs in high resolution imaging.

The present invention has been described in conjunction with preferred embodiments thereof. Experimental results have been provided for the purpose of illustration and not limitation. Many modifications and variations of the disclosed embodiments of the apparatus and method will be apparent to those of ordinary skill in the art. For example, FIG. 15 illustrat s a modification to the excitation portion 12. In FIG. 15, the collimated light enters AOTF 16 as in

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

FIG. 1. However, the light exiting AOTF 16 is input to spatial filters 76. Following the spatial filters 76 is a second excitation AOTF 78. The spatial filters 76 operate to block the undiffracted white light and to input the two polarizations of the light frequency of interest to the second excitation AOTF 78 in a manner which is opposite to the manner in which they exited from AOTF 16. The result is that the two polarizations exit the second excitation AOTF 78 as a collimated beam 80. Because the collimated beam 80 already contains both polarizations of the light wavelength of interest, optics 24, 25, 26, and 27 from FIG. 1 may be replaced by simpler steering optics.

As has been previously mentioned, AOTFs suffer from poor background rejection. By using a second AOTF, additional excitation light may be lost, but background rejection drops off by a factor of between 50 and 100. Typical parameters for both the AOTF 16 and AOTF 78 may be as indicated in the chart set forth above.

Another modification to the present invention has been previously mentioned, and that is the use of the multiline laser as the light source 14. FIG. 16 illustrates a portion of a light microscope constructed according to the teachings of the present invention wherein the light source is a multiline laser 82. The multiline laser light 82 is input to the AOTF 16 and the output is directed by steering mirrors 84 and 86 to a focusing lens 90. Because the light source is a multiline laser 82, the need to combine the two polarizations

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

is eliminated such that mirrors 84 and 86 serve only a steering and not a recombination function. Additionally, between mirrors 84 and 86, pin hole openings may be provided as is known for reducing background radiation. From the focusing lens 90, the light passes through a spinning frosted glass 92, as is known in the art, to make the laser beam uniform and incoherent. Thereafter, the light is input to the microscope input optics 94.

Modifications to the imaging portion of the system illustrated in FIG. 1 are also possible. One possible modification is illustrated in FIG. 17. In FIG. 17, the output of AOTF 38 is sent through a correction prism 96 into the CCD camera 40. As mentioned, an AOTF acts as a diffraction grating causing certain frequencies of light to be deflected more than others. As is known, prisms also act to disperse light, but in a direction opposite to those of AOTF's. By proper selection of the angle and material for the correction prism 96, the deflection of the fluorescence's signal caused by the AOTF 38 can be largely compensated for by the correction prism 96, thereby producing an image with greatly enhanced spatial resolution which can then be input to the CCD camera 40. The crystal 38 may be an apodized crystal.

In FIG. 18, another alternative embodiment for the imaging portion of the system illustrated in FIG. 1 is shown. In FIG. 18, it is anticipated that an excitation system of the type illustrated in FIG. 15 or FIG. 16 has been provided.

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

Under those circumstances, rejection of background may be sufficiently high such that excitation illumination may be focused upon the sample 31 by a bright-field condenser 98.

As an alternative to the configuration of FIG. 18, the epi-illumination arrangement of FIG. 19 may be used. As is known, a dichroic beam splitter 100 is provided so that the excitation illumination is delivered by, and the fluorescence signal is collected by, the objective lens 36. The foregoing disclosure and the following claims are intended to cover all such modifications and variations.

What is claimed is:

1. A light microscope, comprising:

a light source (14);

an acousto-optic tunable filter (16) responsive to said light source for producing two light streams of different polarization;

a control circuit (17) for tuning said tunable filter (16);

devices (24, 25, 26, 27) for combining said two light streams into a combined light stream;

input optics (29) for focusing said combined light stream onto a sample held in a sample plane (31); and

a lens (36) responsive to light from the sample plane (31) for producing an image therefrom.

2. The microscope of claim 1 wherein said devices for combining include a second acousto-optic tunable filter (78) and spatial filters (76) positioned between said acousto-optic tunable filter (16) and said second acousto-optic tunable filter (78), said second acoustic-optic tunable filter (78) being responsive to a second control circuit (17).

3. The microscope of claim 1 wherein said devices for combining include steering optics (24, 25, 26, 27).

4. The microscope of claim 1 including a dark-field condenser (30) positioned between said input optics (29) and the sample plane (31).

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

5. The microscope of claim 1 wherein said light source (14) includes an arc lamp.

6. The microscope of claim 5 wherein said arc lamp light source includes a xenon lamp having an arc less than 1 millimeter in length.

7. The microscope of claim 1 wherein said acousto-optic tunable filter (16) includes a tellurium dioxide crystal.

8. The microscope of claim 1 wherein said control circuit (17) includes a circuit for applying multiplexed signals to said tunable filter (16).

9. The microscope of claim 1 additionally comprising an ultraviolet filter (22) interposed between said light source (14) and said tunable filter (16).

10. The microscope of claim 1 additionally comprising an infrared filter (20) interposed between said light source (14) and said tunable filter (16).

11. The microscope of claim 1 additionally comprising:

an imaging acousto-optic tunable filter (38) responsive to said lens (36) for filtering the image;

a control circuit (17) for tuning said imaging tunable filter (38); and

a processor (44) for processing the filtered image.

12. The microscope of claim 11 additionally comprising a memory (44) for storing the processed image.

13. The light microscope of claim 1 including a dichroic beam splitter (100) positioned so that said input

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

optics (29) and said lens (36) are positioned on the same side of the sample plane (31).

14. A light microscope, comprising:

a light source (14);

a first acousto-optic tunable filter (16) responsive to said light source (14) for producing two light streams of different polarization:

a first control circuit (17) for tuning said first tunable filter (16) to a plurality of frequencies;

devices (24, 25, 26, 27) for combining said two light streams into a combined light stream;

input optics (29) for focusing said combined light stream;

a platform for holding a sample in a sample plane (31);

a condenser (30) for receiving said focused combined light stream and for projecting said light stream onto the sample;

a second acousto-optic tunable filter (38) responsive to light from the sample plane (31);

a second control circuit (17) for tuning said second tunable filter (38) to a plurality of frequencies; and

a processor (44) for processing the light output from said second acousto-optic tunable filter (38).

15. The light microscope of claim 14 wherein said devices for combining include a third acousto-optic tunable filter (78) and spatial filters (76) positioned between said first acousto-optic tunable filter (16) and said third

acousto-optic tunable filter (78), said third acousto-optic tunable filter (78) being responsive to a third control circuit.

16. The light microscope of claim 14 wherein said devices for combining include steering optics (24, 25, 26, 27).

17. The light microscope of claim 14 wherein said light source (14) includes an arc lamp.

18. The light microscope of claim 14 wherein said condenser (30) includes a dark-field condenser.

19. The light microscope of claim 14 wherein said condenser (30) includes a bright-field condenser.

20. The microscope of claim 14 wherein said first and second control circuits (17) include first and second circuits for applying multiplexed signals to said first and second tunable filters (16, 38), respectively.

21. A light microscope, comprising:

a laser light source (82);

an acousto-optic tunable filter (16) responsive to said light source;

a control circuit (17) for tuning said tunable filter (16);

steering optics (84, 86) responsive to said acousto-optic tunable filter (16);

input optics (90), responsive to said steering optics (84, 86), for focusing said light stream onto a sample; and

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

an imaging lens (94) responsive to light from the sample for producing an image therefrom.

22. The light microscope of claim 21 additionally comprising pinhole apertures (88) positioned within said steering optics (84, 86) for rejecting out of bandwidth radiation.

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

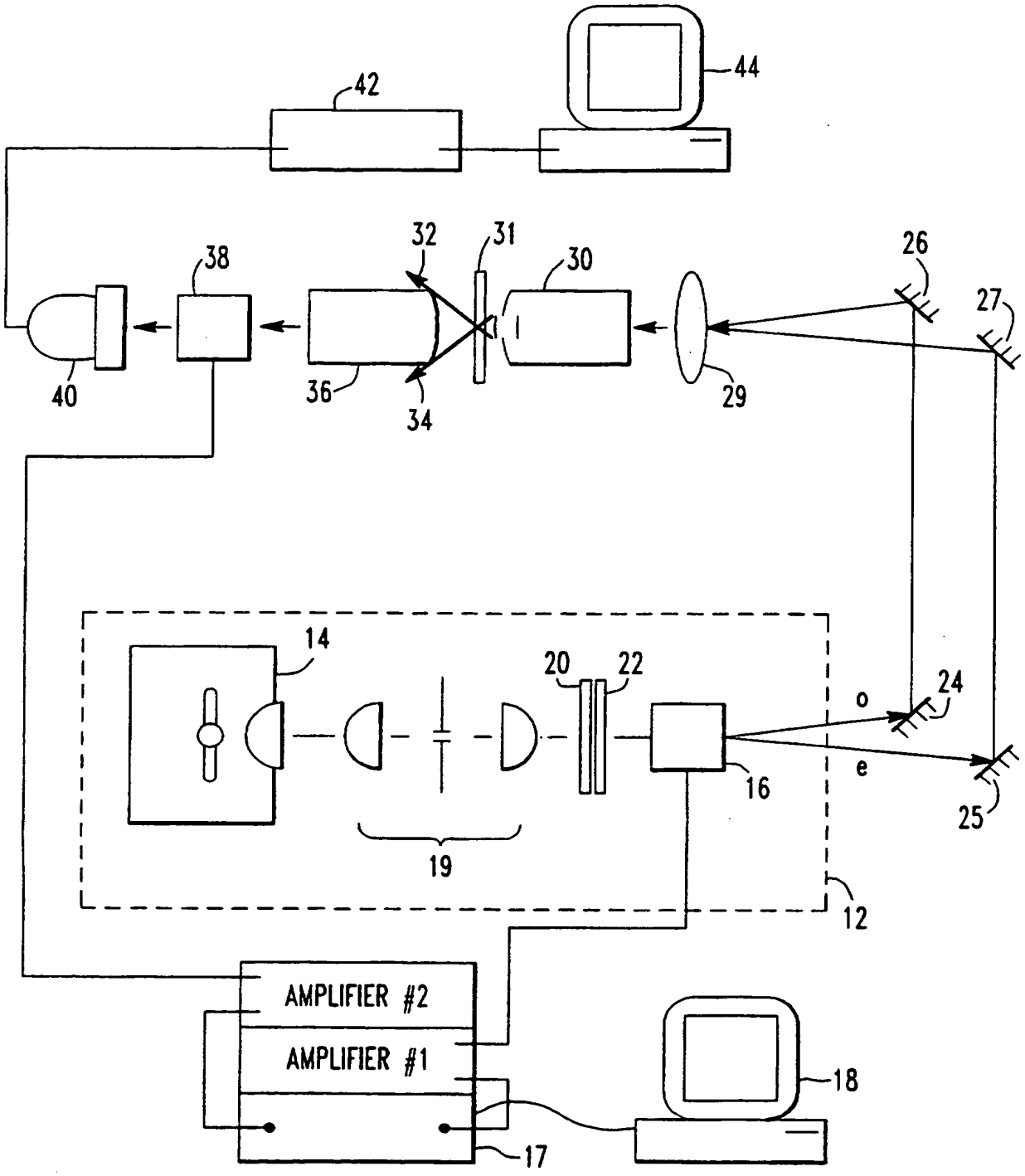


FIG. 1

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

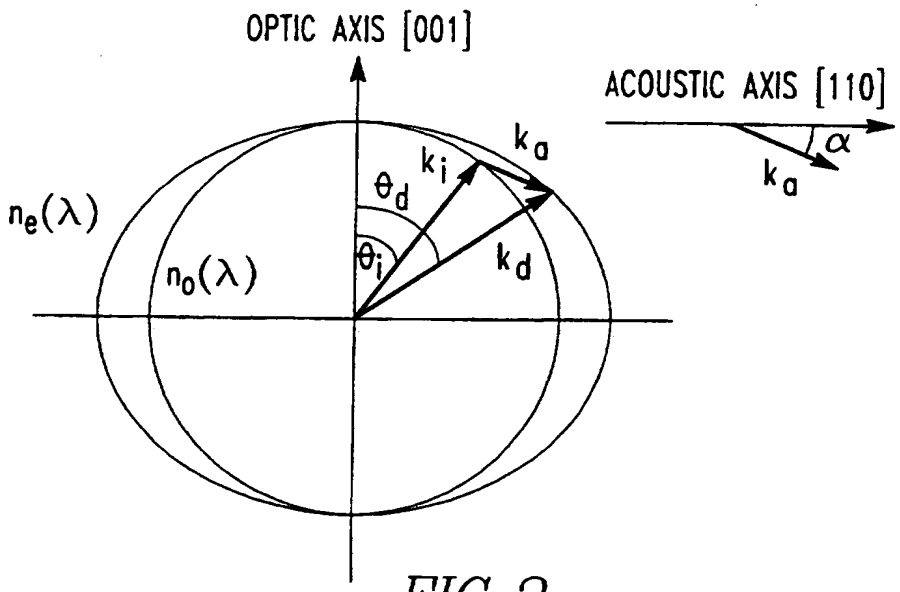


FIG. 2

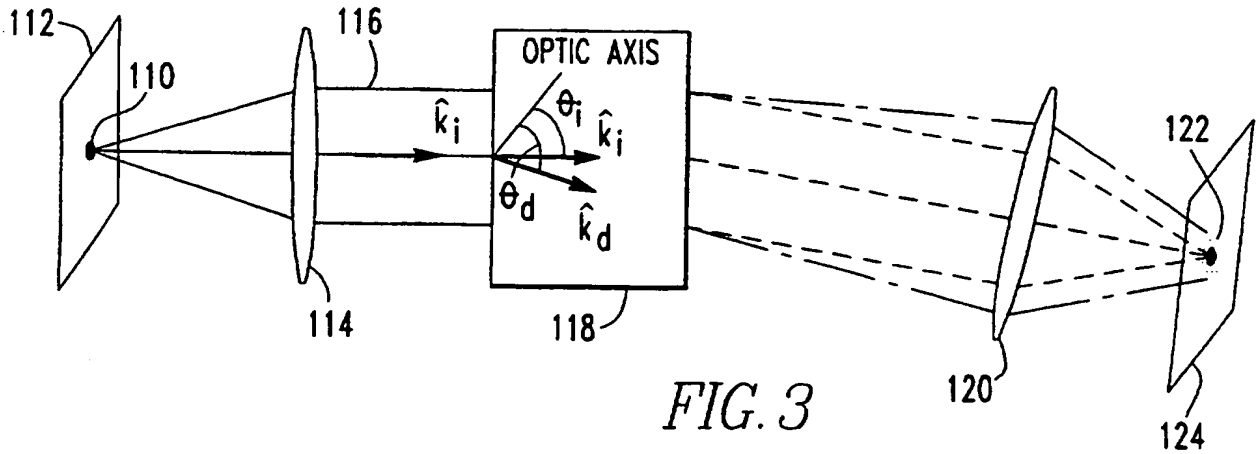


FIG. 3

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

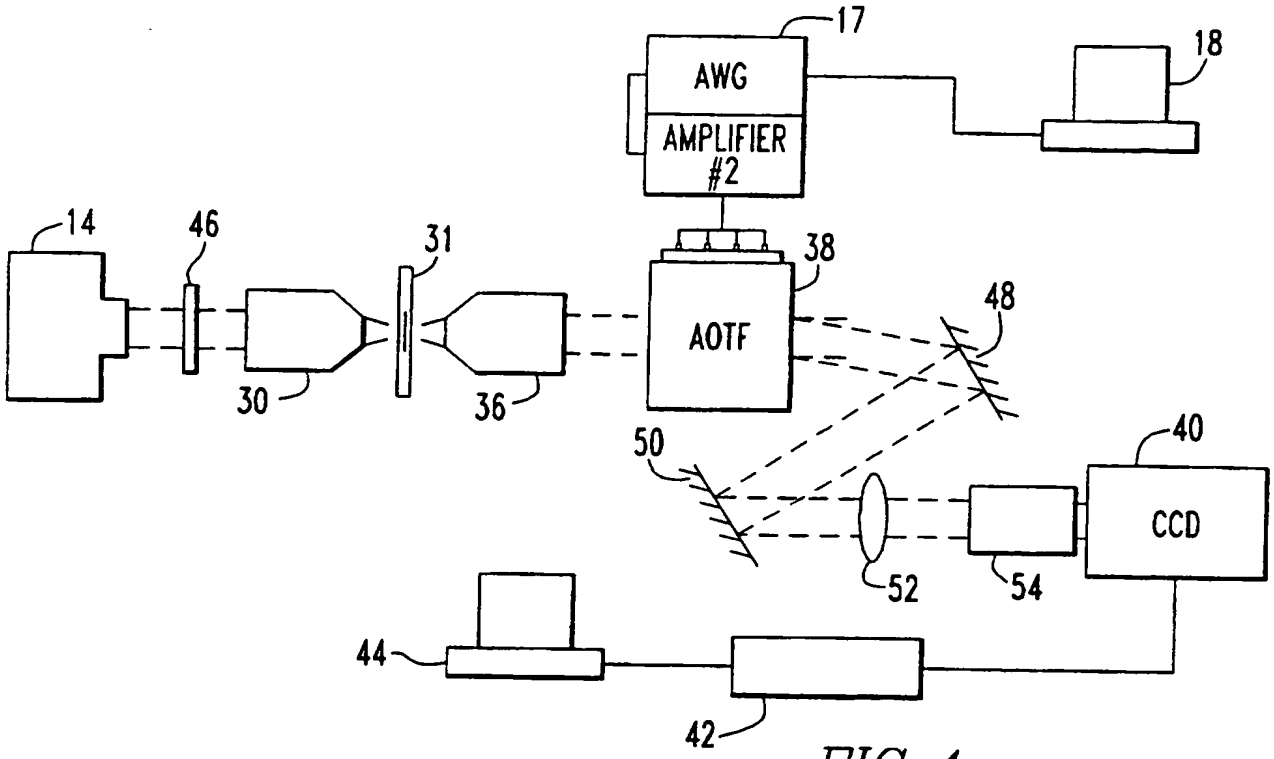


FIG. 4

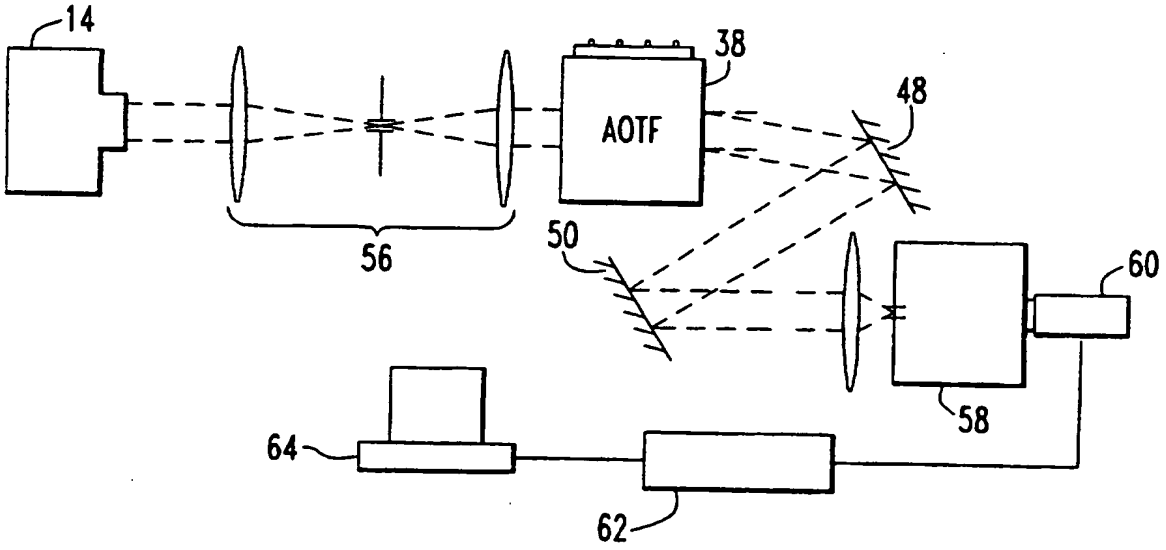


FIG. 5

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

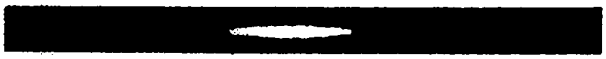


FIG. 6a



FIG. 6b



FIG. 6c

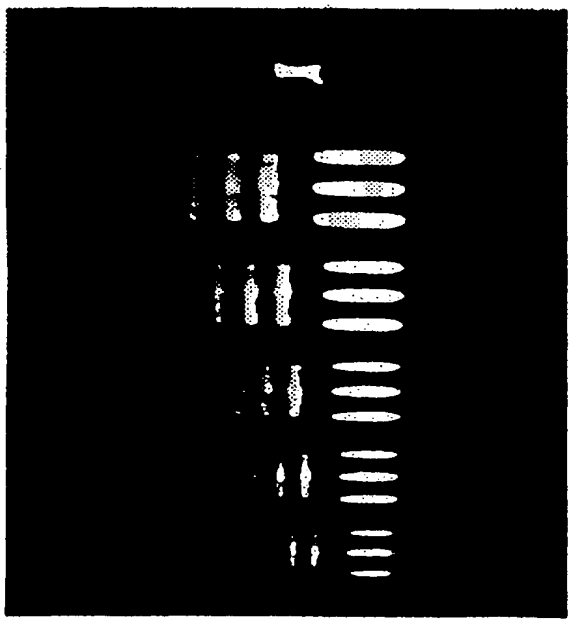


FIG. 8a

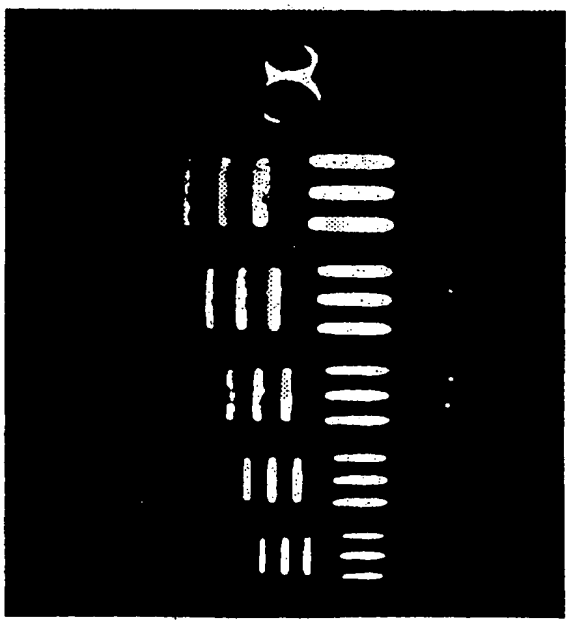


FIG. 8b

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

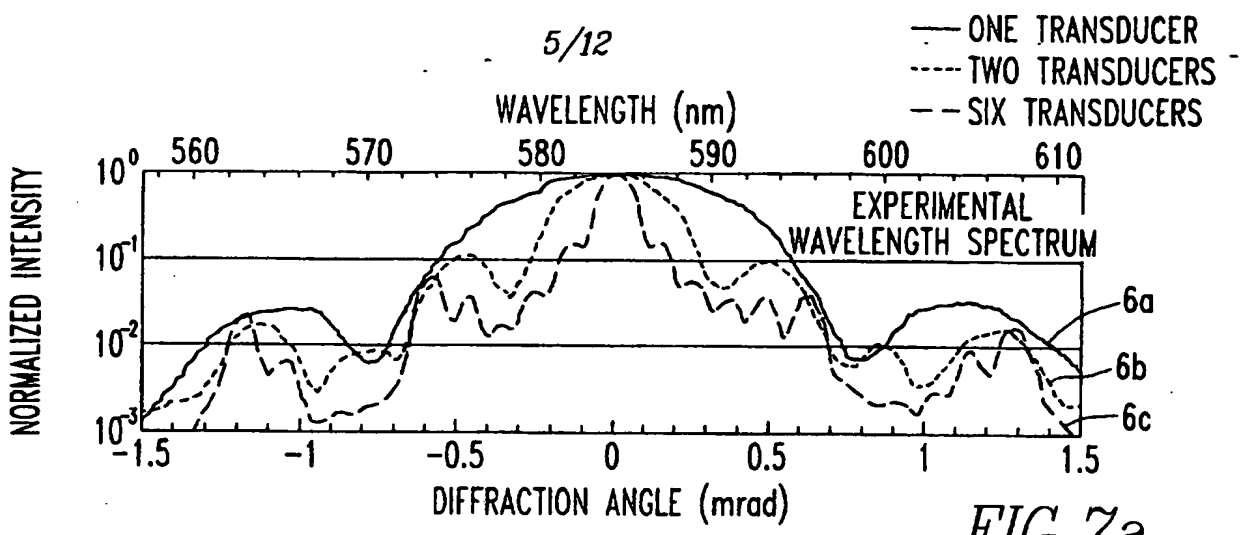


FIG. 7a

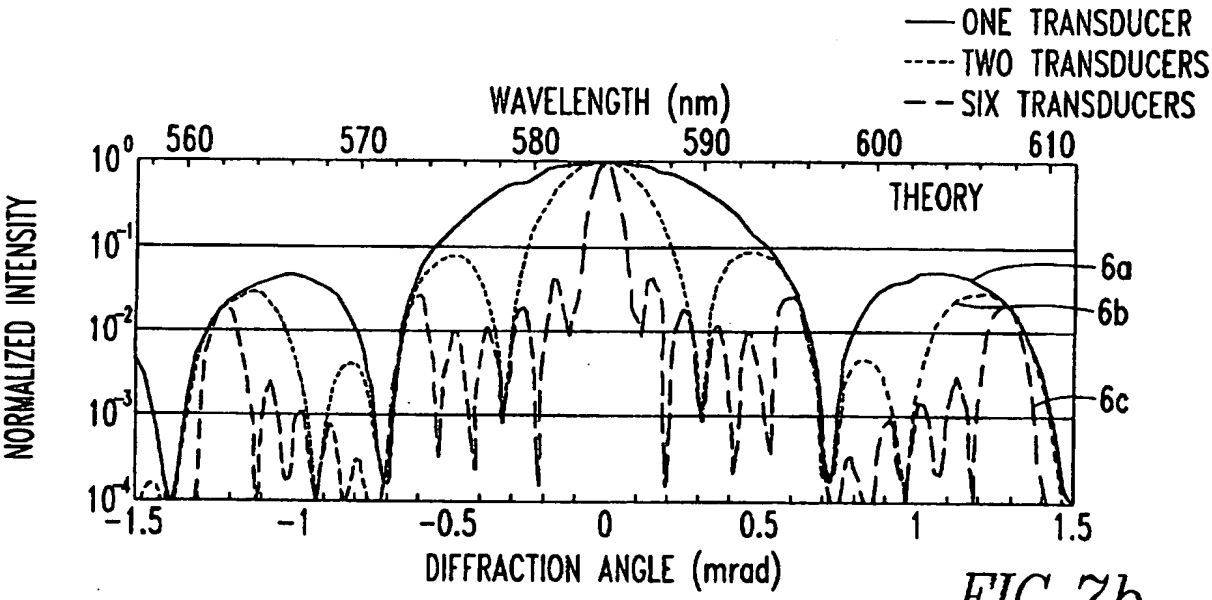


FIG. 7b

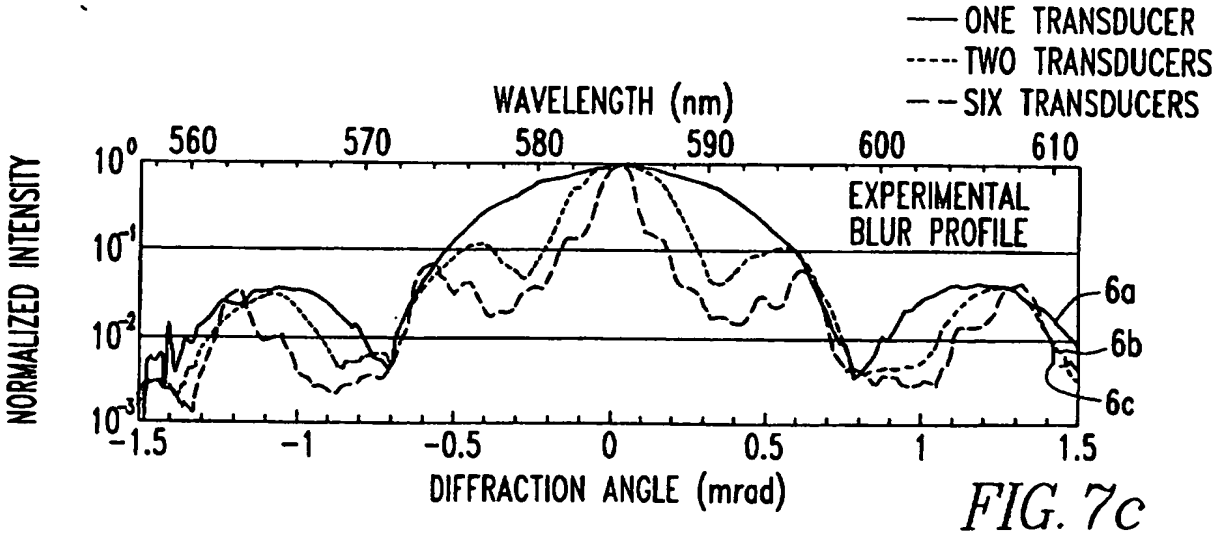
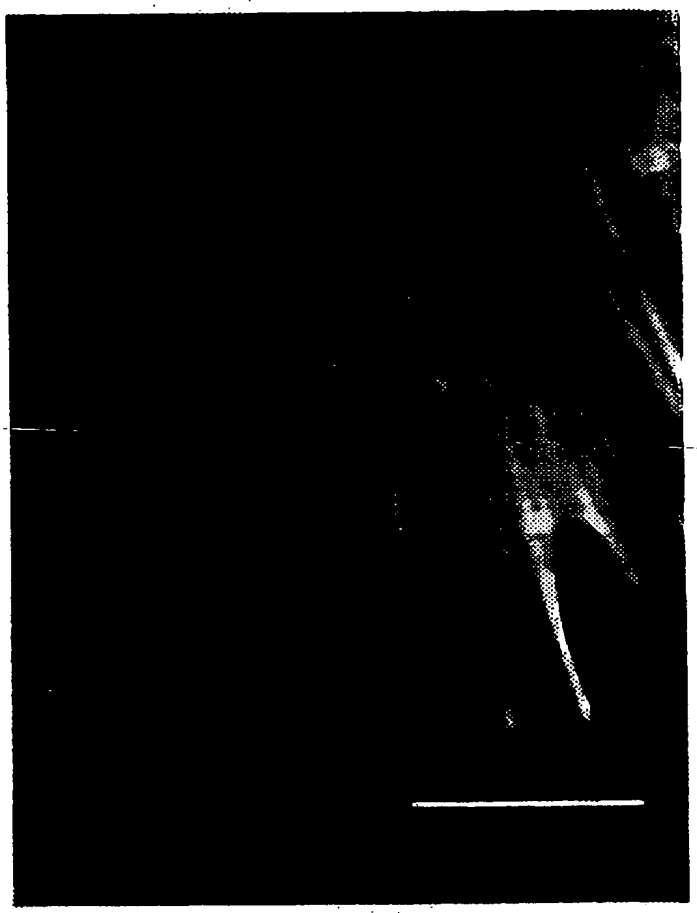


FIG. 7c

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>



40x OBJECTIVE:
RAW IMAGE

FIG. 9a

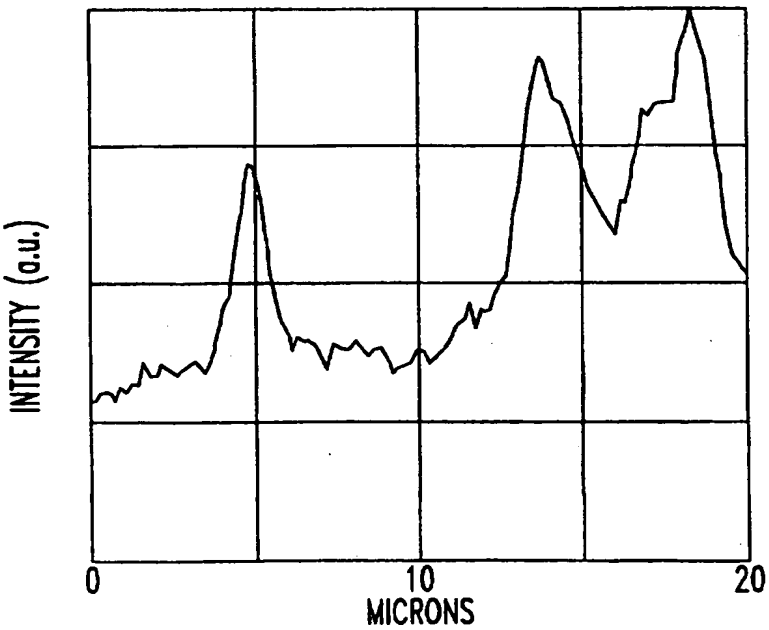
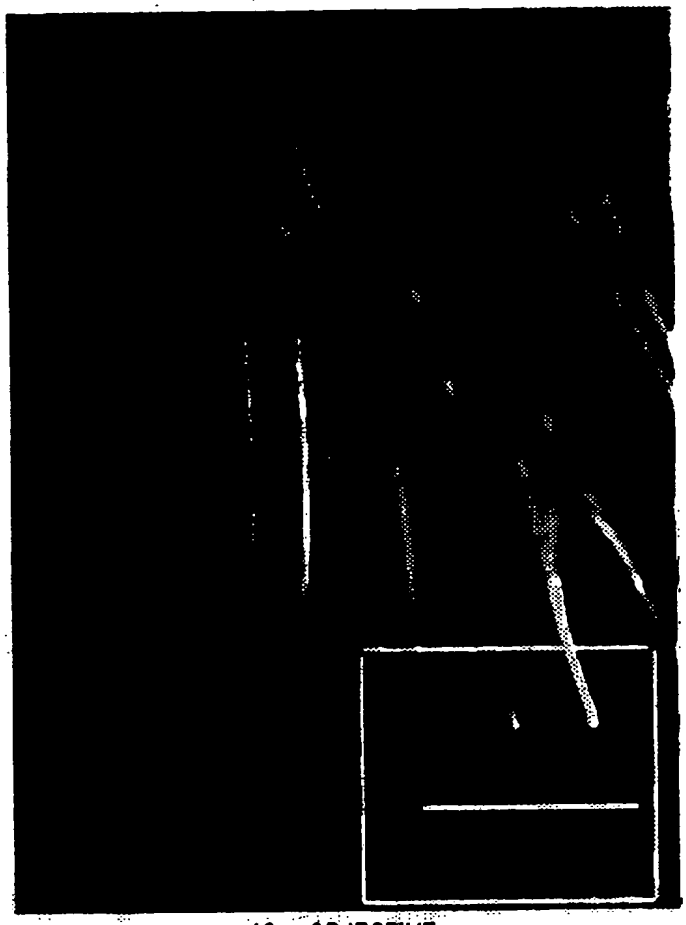


FIG. 9b

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>



40x OBJECTIVE:
DECONVOLVED IMAGE

FIG. 10a

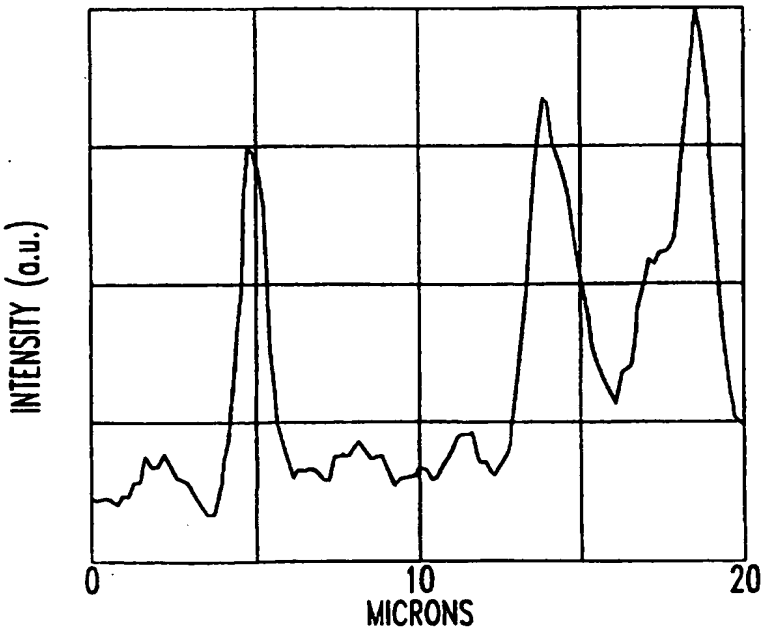
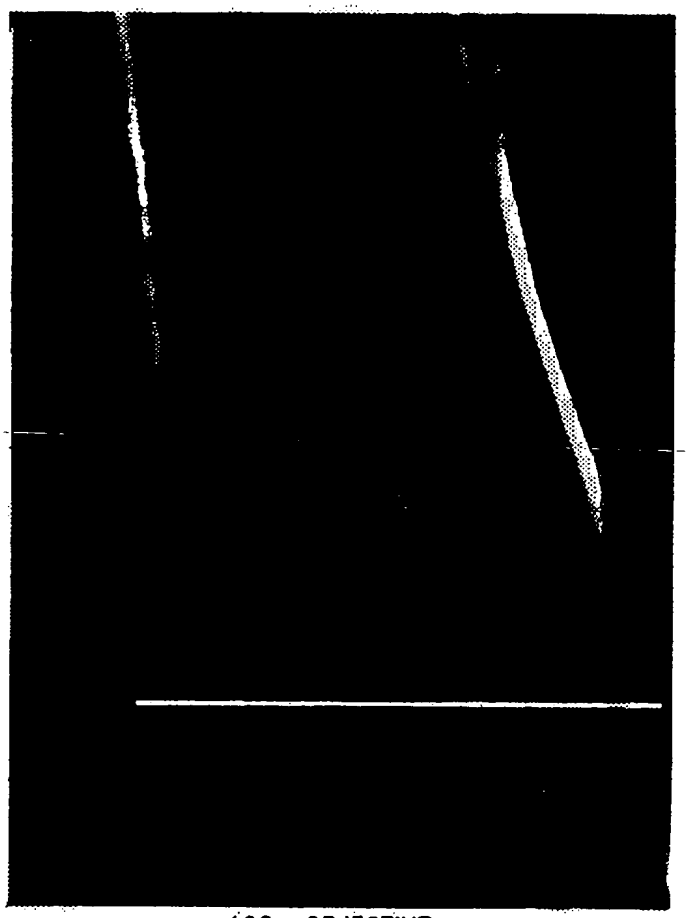


FIG. 10b

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>



100x OBJECTIVE:
DECONVOLVED IMAGE

FIG. 11a

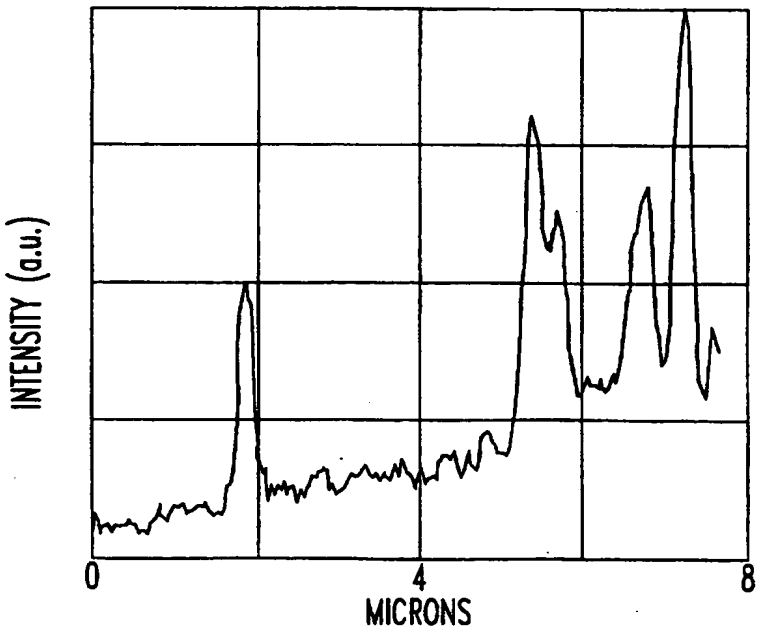


FIG. 11b

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

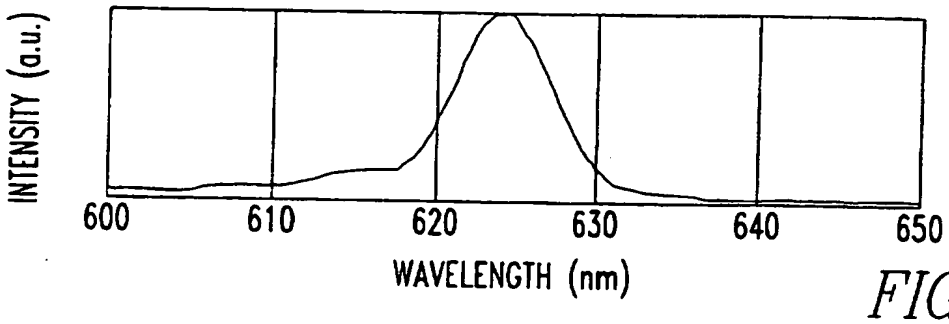


FIG. 12a

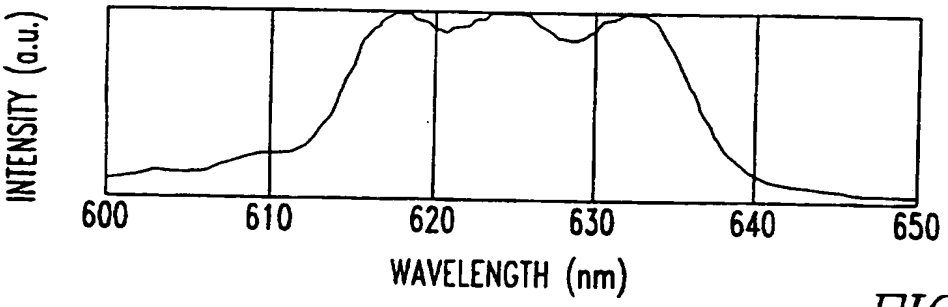


FIG. 12b

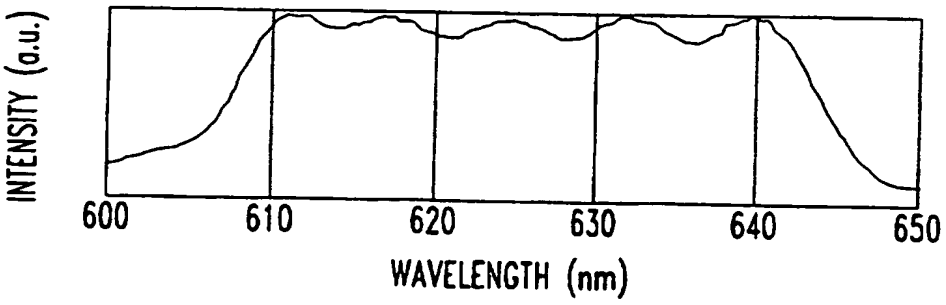


FIG. 12c

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

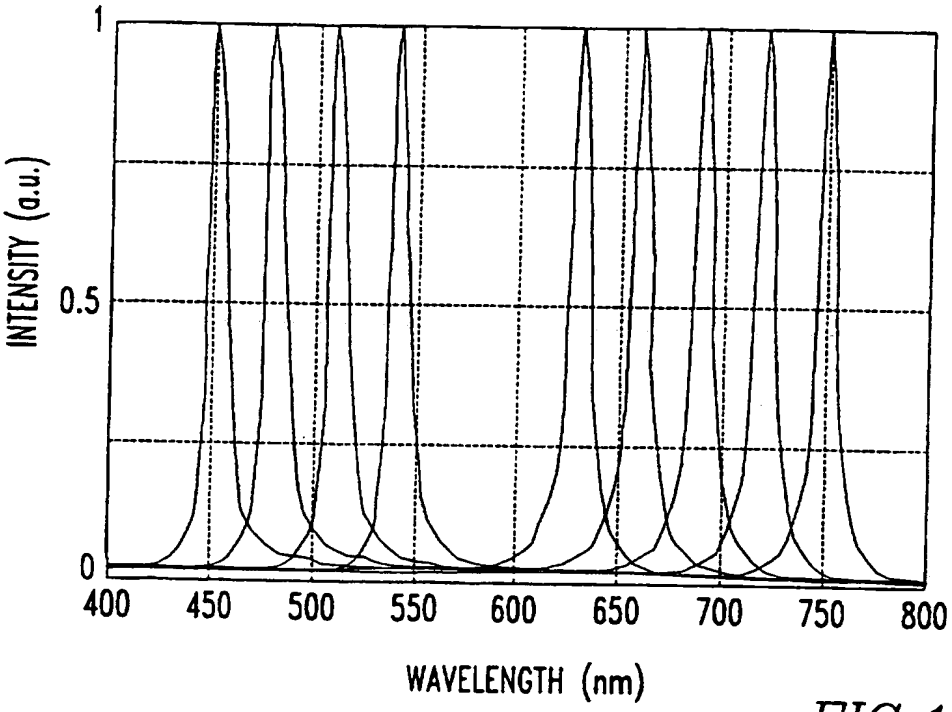


FIG. 13

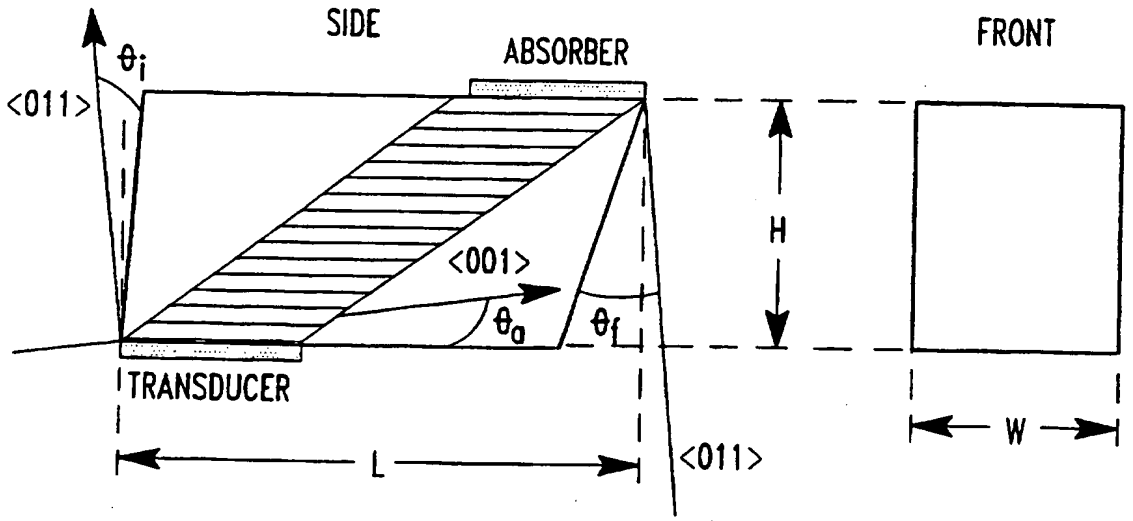


FIG. 14a

FIG. 14b

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

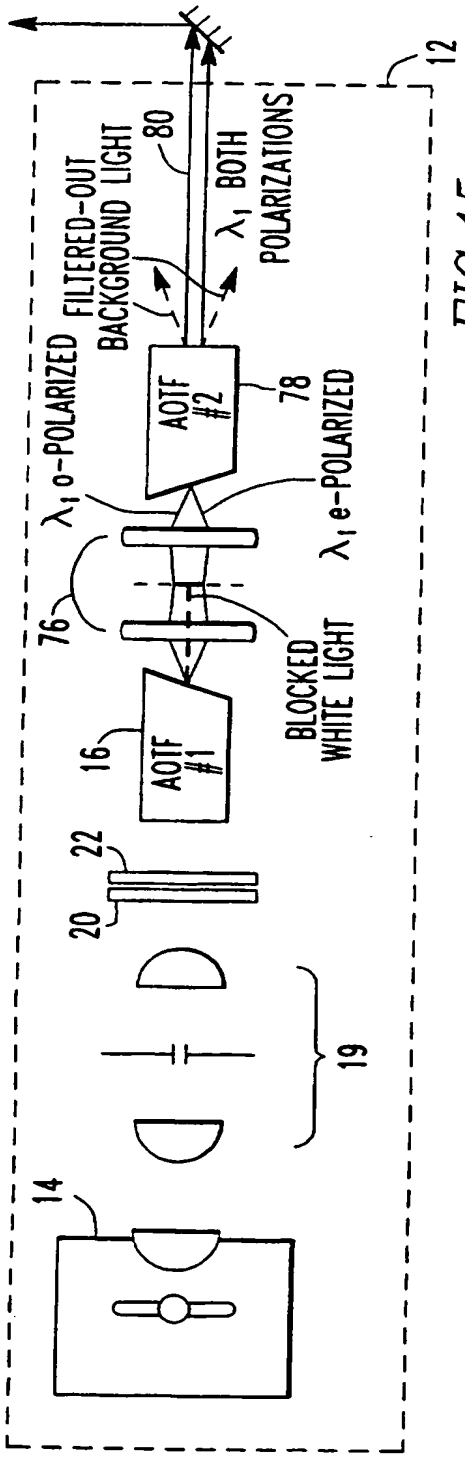


FIG. 15

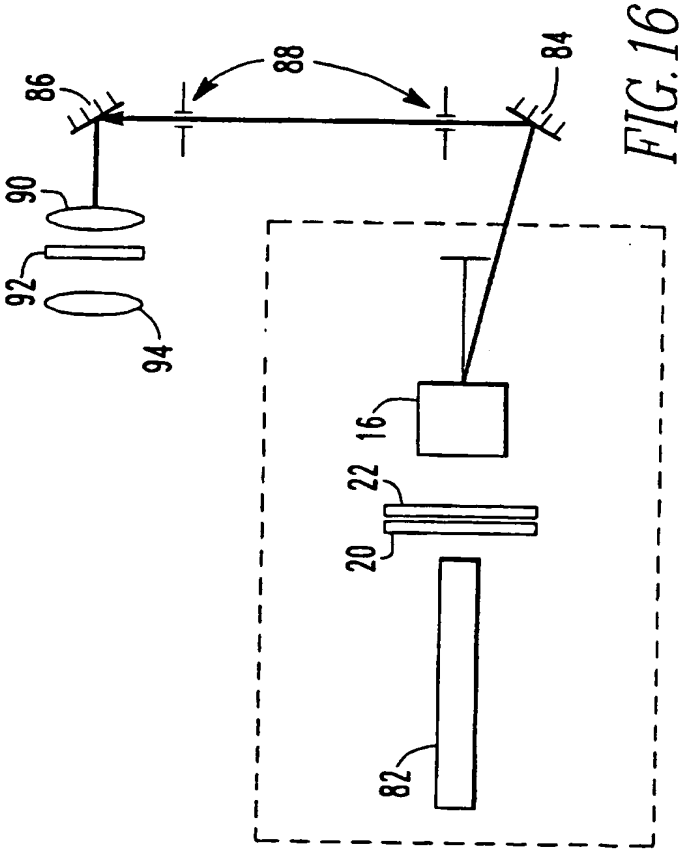


FIG. 16

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

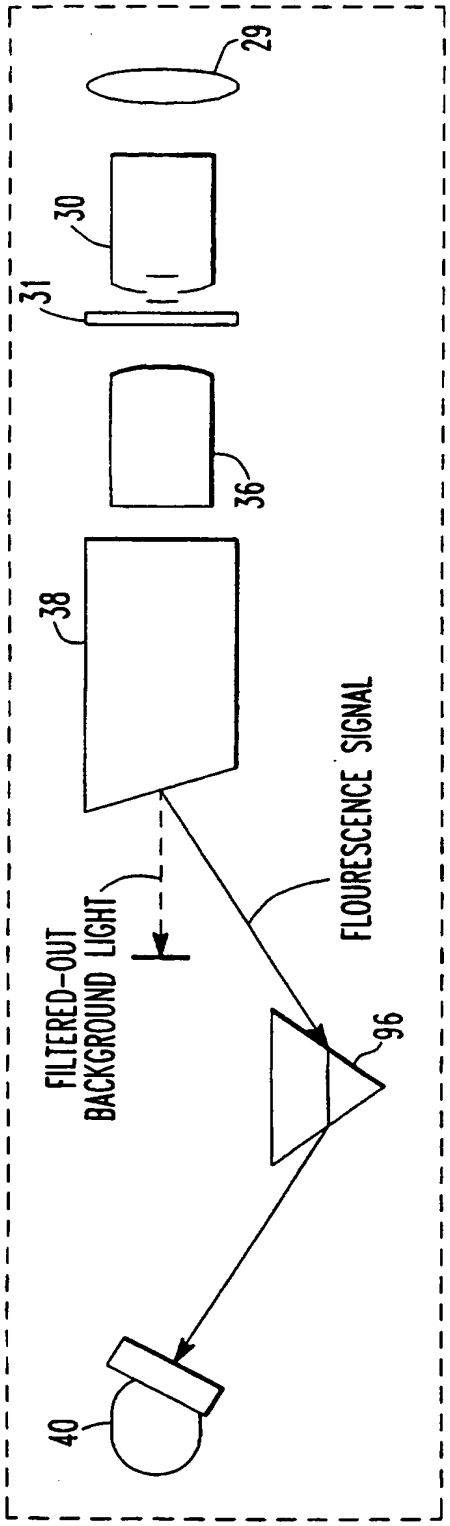


FIG. 17

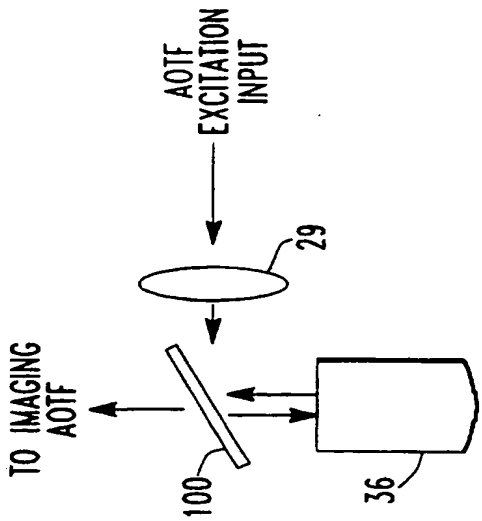


FIG. 19

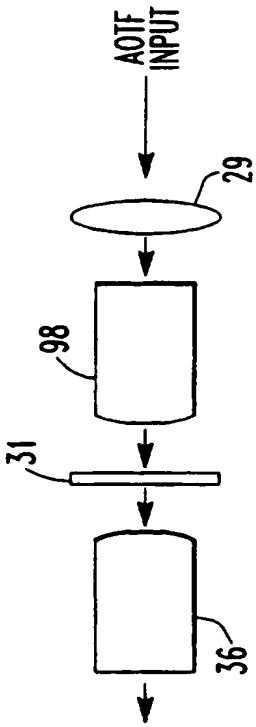


FIG. 18

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter...tional Application No
PCT/US 97/02479

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G02B21/06 G02B21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4 560 278 A (SHINOZAKI TOSHIAKI ET AL) 24 December 1985 see column 2, line 64 - column 4, line 33; figure 1 ---	1,3,5-7, 21
Y	US 5 131 742 A (SCHAFF FRED L) 21 July 1992 see column 3, line 31 - column 5, line 32; figures 1,2 ---	1,3,5-7, 21
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 June 1997	23. 06. 97

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Hessen, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. ional Application No
PCT/US 97/02479

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	QELS `95. SUMMARIES OF PAPERS PRESENTED AT THE QUANTUM ELECTRONICS AND LASER SCIENCE CONFERENCE. VOL.16. 1995 TECHNICAL DIGEST SERIES CONFERENCE EDITION, QELS `95. SUMMARIES OF PAPERS PRESENTED AT THE QUANTUM ELECTRONICS AND LASER SCIENCE CONFERENCE., ISBN 0-7803-2661-X, 1995, WASHINGTON, DC, USA, OPT. SOC. AMERICA, USA, page 164 XP000654655 NITSCHKE R ET AL: "Applications of electro-optic and laser technology to fluorescence microscopy"	1,3
X	see the whole document	21

P,X	APPLIED OPTICS, vol. 35, no. 25, 1 September 1996, pages 5220-5226, XP000628367 WACHMAN E S ET AL: "IMAGING ACOUSTO-OPTIC TUNABLE FILTER WITH 0.35-MICROMETER SPATIAL RESOLUTION" see the whole document	1-22

P,X	US 5 556 790 A (PETTIT JOHN W) 17 September 1996 see column 6, line 57 - column 8, line 67; figure 1	1,2,14, 21

1

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte.. ..ional Application No
PCT/US 97/02479

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4560278 A	24-12-85	JP 1595081 C	27-12-90
		JP 59036220 A	28-02-84
		JP 63025282 B	25-05-88
		DE 3377011 A	14-07-88
		EP 0102714 A	14-03-84
US 5131742 A	21-07-92	NONE	
US 5556790 A	17-09-96	NONE	

BNSDOCID: <WO___9730371A1_I_>

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	**WEITERES VORGEHEN**	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
7346 PCT		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	(Frühestes) Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Jahr)*
PCT/EP 99/10262	22/12/1999	22/12/1998
Anmelder		
CARL ZEISS JENA GMBH et.al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

[X] Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. **Grundlage des Berichts**

 a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

 [] Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

 b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

 [] in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

 [] zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

 [] bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

 [] bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

 [] Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

 [] Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. [] **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. [X] **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

 [X] wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

 [] wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

 [X] wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

 [] wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

 [] wie vom Anmelder vorgeschlagen

 [X] weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

 [] weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

 [] keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/10262

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN **PCT/ISA/ 210**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-8,11

 Anordnung eines lichtbeugenden Elementes zur Separierung von Anregungs- und Emissionslicht in einem Fluoreszenzmikroskop

2. Ansprüche: 9,10

 Anordnung mehrerer lichtbeugender Elemente in einem mikroskopischen Strahlengang zur Einkopplung unterschiedlicher Wellenlängen

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/10262

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G02B21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G02B G01N G02F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, PAJ, WPI Data, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 99 42884 A (ENGELHARDT JOHANN ;LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG (DE); BRADL JOACH) 26. August 1999 (1999-08-26) das ganze Dokument	1-8,11
X	US 4 627 730 A (JUNGERMAN ROGER L ET AL) 9. Dezember 1986 (1986-12-09) Spalte 3, Zeile 56 -Spalte 5, Zeile 34; Abbildungen 1A-1C	1,2,4-6, 11
X	EP 0 503 236 A (IBM) 16. September 1992 (1992-09-16) Seite 11, Zeile 7 -Seite 12, Zeile 3; Abbildung 4E	1,2,5,11

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
4. Oktober 2000	26. OKT. 2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Ciarrocca, M

4

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/10262

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 751 417 A (UHL RAINER) 12. Mai 1998 (1998-05-12) Spalte 5, Zeile 39 -Spalte 6, Zeile 59; Abbildung 1 Spalte 7, Zeile 63 -Spalte 8, Zeile 2	1,4,7
X	EP 0 562 488 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 29. September 1993 (1993-09-29) Spalte 1, Zeile 3 - Zeile 5 Spalte 12, Zeile 35 -Spalte 13, Zeile 18; Abbildung 4	1,2
X	EP 0 620 458 A (NIPPON KOGAKU KK) 19. Oktober 1994 (1994-10-19) Seite 16, Zeile 17 - letzte Zeile; Abbildung 13	1,2
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 448 (P-1423), 17. September 1992 (1992-09-17) & JP 04 157413 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD), 29. Mai 1992 (1992-05-29) Zusammenfassung	8,11
A	WO 97 30371 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 21. August 1997 (1997-08-21) Zusammenfassung; Abbildung 1 Abbildungen 15,17	1,5,11
X	EP 0 327 425 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 9. August 1989 (1989-08-09) Spalte 5, Zeile 52 - Zeile 60 Spalte 7, Zeile 2 - Zeile 42; Abbildungen 5,6	9,11
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 014, no. 059 (P-1000), 2. Februar 1990 (1990-02-02) & JP 01 282515 A (TOKYO ELECTRON LTD), 14. November 1989 (1989-11-14) Zusammenfassung	9,11
X	DE 196 33 185 A (LEICA LASERTECHNIK) 23. Oktober 1997 (1997-10-23) Spalte 4, Zeile 40 - Zeile 55; Abbildung 1	9-11
X	DE 197 02 753 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 30. Juli 1998 (1998-07-30) Spalte 2, Zeile 7 - Zeile 20; Abbildung 1	9,11
X	DE 196 27 568 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 15. Januar 1998 (1998-01-15) Spalte 6, Zeile 62 -Spalte 7, Zeile 16; Abbildung 2	9

-/--

4

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/10262

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 148 803 A (SFENA ;AUTOMATES ET AUTOMATISMES SA (FR)) 17. Juli 1985 (1985-07-17) Zusammenfassung; Abbildung 1	9,11

4

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/10262

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9942884 A	26-08-1999	DE 19906757 A	02-12-1999
US 4627730 A	09-12-1986	EP 0167410 A	08-01-1986
		JP 61105522 A	23-05-1986
EP 0503236 A	16-09-1992	US 5208648 A	04-05-1993
		JP 1987116 C	08-11-1995
		JP 5157701 A	25-06-1993
		JP 7018806 B	06-03-1995
		US 5220403 A	15-06-1993
US 5751417 A	12-05-1998	DE 19510102 C	02-10-1996
		GB 2299235 A,B	25-09-1996
EP 0562488 A	29-09-1993	JP 6095038 A	08-04-1994
		DE 69315871 D	05-02-1998
		DE 69315871 T	16-04-1998
		DE 562488 T	17-11-1994
		US 5978109 A	02-11-1999
		US 5496995 A	05-03-1996
EP 0620458 A	19-10-1994	JP 7073500 A	17-03-1995
		JP 6088913 A	29-03-1994
		JP 6160718 A	07-06-1994
		US 5452382 A	19-09-1995
		WO 9406041 A	17-03-1994
JP 04157413 A	29-05-1992	KEINE	
WO 9730371 A	21-08-1997	US 5841577 A	24-11-1998
		AU 2128697 A	02-09-1997
		EP 0883829 A	16-12-1998
EP 0327425 A	09-08-1989	FR 2626383 A	28-07-1989
		DE 68906040 D	27-05-1993
		DE 68906040 T	14-10-1993
		JP 1245215 A	29-09-1989
		US 4965441 A	23-10-1990
JP 01282515 A	14-11-1989	KEINE	
DE 19633185 A	23-10-1997	WO 9739375 A	23-10-1997
		EP 0894278 A	03-02-1999
		JP 2000508438 T	04-07-2000
DE 19702753 A	30-07-1998	KEINE	
DE 19627568 A	15-01-1998	KEINE	
EP 0148803 A	17-07-1985	FR 2557985 A	12-07-1985
		DE 3568502 D	06-04-1989
		WO 8503141 A	18-07-1985
		FR 2575840 A	11-07-1986
		JP 61502423 T	23-10-1986

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/10262

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9942884 A	26-08-1999	DE 19906757 A	02-12-1999
US 4627730 A	09-12-1986	EP 0167410 A	08-01-1986
		JP 61105522 A	23-05-1986
EP 0503236 A	16-09-1992	US 5208648 A	04-05-1993
		JP 1987116 C	08-11-1995
		JP 5157701 A	25-06-1993
		JP 7018806 B	06-03-1995
		US 5220403 A	15-06-1993
US 5751417 A	12-05-1998	DE 19510102 C	02-10-1996
		GB 2299235 A,B	25-09-1996
EP 0562488 A	29-09-1993	JP 6095038 A	08-04-1994
		DE 69315871 D	05-02-1998
		DE 69315871 T	16-04-1998
		DE 562488 T	17-11-1994
		US 5978109 A	02-11-1999
		US 5496995 A	05-03-1996
EP 0620458 A	19-10-1994	JP 7073500 A	17-03-1995
		JP 6088913 A	29-03-1994
		JP 6160718 A	07-06-1994
		US 5452382 A	19-09-1995
		WO 9406041 A	17-03-1994
JP 04157413 A	29-05-1992	NONE	
WO 9730371 A	21-08-1997	US 5841577 A	24-11-1998
		AU 2128697 A	02-09-1997
		EP 0883829 A	16-12-1998
EP 0327425 A	09-08-1989	FR 2626383 A	28-07-1989
		DE 68906040 D	27-05-1993
		DE 68906040 T	14-10-1993
		JP 1245215 A	29-09-1989
		US 4965441 A	23-10-1990
JP 01282515 A	14-11-1989	NONE	
DE 19633185 A	23-10-1997	WO 9739375 A	23-10-1997
		EP 0894278 A	03-02-1999
		JP 2000508438 T	04-07-2000
DE 19702753 A	30-07-1998	NONE	
DE 19627568 A	15-01-1998	NONE	
EP 0148803 A	17-07-1985	FR 2557985 A	12-07-1985
		DE 3568502 D	06-04-1989
		WO 8503141 A	18-07-1985
		FR 2575840 A	11-07-1986
		JP 61502423 T	23-10-1986

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ational Application No
PCT/EP 99/10262

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G02B21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G02B G01N G02F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, PAJ, WPI Data, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 99 42884 A (ENGELHARDT JOHANN ;LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG (DE); BRADL JOACH) 26 August 1999 (1999-08-26) the whole document	1-8,11
X	US 4 627 730 A (JUNGERMAN ROGER L ET AL) 9 December 1986 (1986-12-09) column 3, line 56 -column 5, line 34; figures 1A-1C	1,2,4-6, 11
X	EP 0 503 236 A (IBM) 16 September 1992 (1992-09-16) page 11, line 7 -page 12, line 3; figure 4E	1,2,5,11

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 October 2000	26.10.00

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Ciarrocca, M

4

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) D CUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 751 417 A (UHL RAINER) 12 May 1998 (1998-05-12) column 5, line 39 -column 6, line 59; figure 1 column 7, line 63 -column 8, line 2	1,4,7
X	EP 0 562 488 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 29 September 1993 (1993-09-29) column 1, line 3 - line 5 column 12, line 35 -column 13, line 18; figure 4	1,2
X	EP 0 620 458 A (NIPPON KOGAKU KK) 19 October 1994 (1994-10-19) page 16, line 17 - last line; figure 13	1,2
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 448 (P-1423), 17 September 1992 (1992-09-17) & JP 04 157413 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD), 29 May 1992 (1992-05-29) abstract	8,11
A	WO 97 30371 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 21 August 1997 (1997-08-21) abstract; figure 1 figures 15,17	1,5,11
X	EP 0 327 425 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 9 August 1989 (1989-08-09) column 5, line 52 - line 60 column 7, line 2 - line 42; figures 5,6	9,11
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 014, no. 059 (P-1000), 2 February 1990 (1990-02-02) & JP 01 282515 A (TOKYO ELECTRON LTD), 14 November 1989 (1989-11-14) abstract	9,11
X	DE 196 33 185 A (LEICA LASERTECHNIK) 23 October 1997 (1997-10-23) column 4, line 40 - line 55; figure 1	9-11
X	DE 197 02 753 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 30 July 1998 (1998-07-30) column 2, line 7 - line 20; figure 1	9,11
X	DE 196 27 568 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 15 January 1998 (1998-01-15) column 6, line 62 -column 7, line 16; figure 2	9

-/—

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. tional Application No
PCT/EP 99/10262

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 148 803 A (SFENA ;AUTOMATES ET AUTOMATISMES SA (FR)) 17 July 1985 (1985-07-17) abstract; figure 1	9,11

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/10262

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9942884 A	26-08-1999	DE 19906757 A	02-12-1999
US 4627730 A	09-12-1986	EP 0167410 A	08-01-1986
		JP 61105522 A	23-05-1986
EP 0503236 A	16-09-1992	US 5208648 A	04-05-1993
		JP 1987116 C	08-11-1995
		JP 5157701 A	25-06-1993
		JP 7018806 B	06-03-1995
		US 5220403 A	15-06-1993
US 5751417 A	12-05-1998	DE 19510102 C	02-10-1996
		GB 2299235 A,B	25-09-1996
EP 0562488 A	29-09-1993	JP 6095038 A	08-04-1994
		DE 69315871 D	05-02-1998
		DE 69315871 T	16-04-1998
		DE 562488 T	17-11-1994
		US 5978109 A	02-11-1999
		US 5496995 A	05-03-1996
EP 0620458 A	19-10-1994	JP 7073500 A	17-03-1995
		JP 6088913 A	29-03-1994
		JP 6160718 A	07-06-1994
		US 5452382 A	19-09-1995
		WO 9406041 A	17-03-1994
JP 04157413 A	29-05-1992	NONE	
WO 9730371 A	21-08-1997	US 5841577 A	24-11-1998
		AU 2128697 A	02-09-1997
		EP 0883829 A	16-12-1998
EP 0327425 A	09-08-1989	FR 2626383 A	28-07-1989
		DE 68906040 D	27-05-1993
		DE 68906040 T	14-10-1993
		JP 1245215 A	29-09-1989
		US 4965441 A	23-10-1990
JP 01282515 A	14-11-1989	NONE	
DE 19633185 A	23-10-1997	WO 9739375 A	23-10-1997
		EP 0894278 A	03-02-1999
		JP 2000508438 T	04-07-2000
DE 19702753 A	30-07-1998	NONE	
DE 19627568 A	15-01-1998	NONE	
EP 0148803 A	17-07-1985	FR 2557985 A	12-07-1985
		DE 3568502 D	06-04-1989
		WO 8503141 A	18-07-1985
		FR 2575840 A	11-07-1986
		JP 61502423 T	23-10-1986